

Aus der
Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie der Haustiere
mit Ambulatorium, Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. M. Berchtold)

UNTERSUCHUNGEN ZUR AKTIVITÄT UND BEDEUTUNG DES KOMPLEMENTSYSTEMS IN DER MILCHDRÜSE DES RINDES

Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi für das
Fachgebiet Rinderkrankheiten, speziell Gynäkologie

Zürich, 1986

Vorgelegt von
Robert Müller
Tierarzt
von Ossingen



Aus der
Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie der Haustiere
mit Ambulatorium, Universität Zürich
(Direktor: Prof. Dr. M. Berchtold)

UNTERSUCHUNGEN ZUR AKTIVITÄT UND BEDEUTUNG DES KOMPLEMENTSYSTEMS IN DER MILCHDRÜSE DES RINDES

Habilitationsschrift zur Erlangung der Venia legendi für das
Fachgebiet Rinderkrankheiten, speziell Gynäkologie

Zürich, 1986

Vorgelegt von
Robert Müller
Tierarzt
von Ossingen



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507222_0014

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	3
B. LITERATURÜBERSICHT	5
1. Das Komplementsystem des Menschen	5
a. Geschichtlicher Überblick	5
b. Nomenklatur und Terminologie	7
c. Aktivierung des Komplementsystems	9
d. Biologische Aktivitäten des Komplementsystems	17
2. Der Phagozytose-Prozess	24
3. Das Komplementsystem des Rindes	27
4. Komplement in der Milchdrüse des Rindes	30
C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	31
1. Ablauf der Untersuchungen	31
2. Material und Methodik	32
3. Resultate	33
a. Komplementaktivität im Blutserum	33
b. Komplementaktivität in der Milch	36
c. Komplementaktivität im Kolostrum	44
d. Komplementaktivität während der Trockenzeit	47
e. Aktivität des alternativen Reaktionsweges in der Milch	52
f. Komplementaktivierung durch E. coli	53
g. Komplementaktivität bei experimentellen Mastitiden	56
h. Antikomplementäre Aktivität in Milch, Trockensekret und Kolostrum	68
i. Fixation von Komplement C3 an die Oberfläche von E. coli	76
k. Einfluss von Komplement auf die Phagozytoserate von Milchleukozyten	81
4. Diskussion	85

D. ZUSAMMENFASSUNG	99
E. ANHANG 1 - 6	101
F. LITERATURVERZEICHNIS	113

A. EINLEITUNG

Die Erkrankungen der Milchdrüse stellen auch heute noch die häufigste Erkrankung der Milchkühe dar und stellen jede moderne Milchwirtschaft sowohl in ökonomischer wie auch in technologischer Hinsicht vor grosse Probleme. Nach der Bekämpfung der klassischen Infektionskrankheiten wie der Tuberkulose und der Brucellose ist deshalb die systematische Mastitisbekämpfung weltweit schon seit geraumer Zeit in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Dank der enormen Anstrengungen, die auf diesem Gebiet unternommen wurden, sind die Kenntnisse über die Faktoren, die bei der Entstehung der Mastitis beteiligt sind, sehr weit fortgeschritten und es stehen heute durchaus Mittel und Wege zur Verfügung, um das Mastitisproblem innerhalb einer Herde auf ein ökonomisch und hygienisch vertretbares Mass zu reduzieren. Im Mittelpunkt aller dieser Anstrengungen stehen drei Massnahmen:

1. Optimierung der Melktechnik und der Melkanlagen
2. Reduktion der Erregerübertragung durch Zitzendesinfektion nach dem Melken
3. Chemotherapie

Es ist unbestritten, dass dieses Massnahmenpaket, zusammen mit weiteren flankierenden Mitteln, zu einer Reduzierung der Mastitishäufigkeit führt. Andererseits ist aber auch klar, dass damit keine Ausrottung der Mastitiden erreicht werden kann. Im Gegensatz zu den klassischen Seuchen des Rindes wird die Mastitis nicht durch einen einzelnen spezifischen Erreger verursacht. An der Entstehung einer Mastitis sind vielmehr zahlreiche Faktoren beteiligt. Neben einer Vielzahl von bekannten Umwelteinflüssen spielen sowohl die genetisch bedingte Resistenz und die erworbene Immunität bei der Abwehr der in

der Regel ubiquitär vorkommenden euterpathogenen Mikroorganismen eine bedeutende Rolle.

Von diesem Wechselspiel zwischen Umwelteinflüssen, Erregern und der Abwehr des Tieres sind die ersten beiden Punkte gut erforscht und ihre Bedeutung und ihr Einfluss auf die Mastitishäufigkeit sind heute weitgehend bekannt. Aus diesem Grunde konzentriert sich das Interesse hinsichtlich der Bekämpfung von Euterinfektionen in neuester Zeit in zunehmendem Masse auf die Bedeutung der natürlichen Abwehrmechanismen der Milchdrüse. Diese lassen sich grundsätzlich drei Systemen zuordnen:

1. Unspezifische zelluläre Abwehr
2. Unspezifische humorale Abwehr
3. Spezifische immunologische Abwehr

Da die zahlreichen Versuche zur Steigerung der spezifischen immunologischen Abwehr durch Vakzination gegen Mastitis-erreger bislang nur zu unbefriedigenden Ergebnissen geführt haben, richtet sich das Augenmerk in letzter Zeit vor allem auf die Bedeutung der unspezifischen Abwehr im Euter.

Im Lichte der neueren Kenntnisse über Infektionsabwehr ist zwar klar geworden, dass diese drei Systeme funktionell nicht gesondert betrachtet werden sollten, sondern dass sie in einer engen Beziehung zueinander stehen. Trotzdem ist es für die Erarbeitung der grundlegenden Kenntnisse und für die Abklärung der Frage nach dem schwachen Glied in der Infektionsabwehr des Euters hilfreich, die einzelnen Systeme unabhängig von anderen Einflüssen zu untersuchen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, abzuklären, wie weit das Komplementsystem als ein phylogenetisch sehr altes, unspezifisches, humorales Abwehrsystem in der Milch-

drüse des Rindes präsent ist und welche Bedeutung diesem System bei der Abwehr von Mastitiserregern zukommen könnte.

B. LITERATURÜBERSICHT

1. Das Komplementsystem des Menschen

a. Geschichtlicher Überblick

Die Entdeckung des Komplementsystems wird PFEIFFER und ISSAEF zugeschrieben und geht auf ihre Experimente im Jahre 1894 zurück (7,139). Sie entdeckten, dass Choleravibrionen aufgelöst wurden, wenn diese in die Bauchhöhle von Meerschweinchen, die bereits früher eine Vibrioneninfektion durchgemacht hatten, injiziert wurden. In weiteren Experimenten fanden sie, dass diese Immunität spezifisch war für das Antigen und dass sie durch Bluttransfusionen auf normale Meerschweinchen übertragbar war. Sie stellten auch fest, dass durch Erhitzen des Serums diese Immunität *in vitro* zerstört wurde, dass sie aber noch immer auf normale Meerschweinchen übertragbar war. Sie schlossen daraus, dass hitzeresistente Antikörper im Serum für die Immunität gegen Cholera verantwortlich waren und dass diese Antikörper zusammen mit einer hitzelabilen Substanz zur Lyse der Choleravibrionen führte.

Im Jahre 1898 wurden diese Experimente von BORDET bestätigt (7,139). Er demonstrierte *in vitro*, dass frisches normales Serum eine hitzeempfindliche Substanz enthält, die in der Lage ist, zusammen mit spezifischen Antikörpern Bakterien aufzulösen. In weiteren Experimenten beschrieb er auch die Lyse von Erythrozyten nach Inkubation mit Antikörpern und "Alexin", wie Komplement damals genannt wurde. Er zeigte auch,

dass sich dieses hämolytische System für den Nachweis von Alexin ausgezeichnet eignete. Es war auch um diese Zeit, als EHRlich für das Alexin die Bezeichnung Komplement vorschlug (7). Diese Bezeichnung hat sich bis heute gehalten, obschon es sich im Verlaufe der Jahre gezeigt hat, dass Komplement nicht eine einzelne Substanz ist, sondern dass es sich um ein komplexes Proteinsystem handelt.

Im Jahre 1901 beschrieben BORDET und GENOUD erstmals die Komplement-Bindungs-Reaktion (KBR) als Test für die Identifikation von Antikörpern gegen eine Vielzahl verschiedener Antigene (7). Obwohl recht kompliziert und anspruchsvoll in ihrer Durchführung, hat sich die KBR in einigen diagnostischen Anwendungen bis in die heutige Zeit halten können und erst seit einigen Jahren wird sie zunehmend von moderneren Methoden verdrängt.

Nach 1920 wurden auch die neueren Fraktionierungsverfahren in der Komplementforschung eingesetzt. Es zeigte sich dann im Verlaufe vieler Jahre, dass Komplement nicht eine einzelne Substanz ist, sondern dass es sich um ein kompliziertes System von Serumproteinen handelt, dass diese Proteine in ganz bestimmter Reihenfolge miteinander reagieren und dass erst der letzte Schritt dieser Kettenreaktion zur Lyse von Erythrozyten und Bakterien führt.

Ein weiterer Meilenstein war die Entdeckung von PILLEMER im Jahre 1954 (133). Er zeigte erstmals, dass Zellwandpräparationen von Hefen, bekannt als Zymosan, auch in Abwesenheit spezifischer Antikörper in der Lage sind, Komplement zu aktivieren. Damit war der alternative Reaktionsweg entdeckt, obschon die Wissenschaft sich für fast 15 Jahre lang nicht einigen konnte, ob die Ergebnisse von PILLEMER richtig waren.

Die Einführung der modernen Fraktionierungsverfahren in die Proteinchemie führte Ende der 60er Jahre zu einem wahren Boom in der Komplementforschung und die Isolation und Rein-

darstellung einzelner Komponenten führte sehr rasch zu einem besseren Verständnis dieses komplexen Proteinsystems.

b. Nomenklatur und Terminologie

Zur Zeit werden 21 verschiedene Proteine im Komplementsystem zusammengefasst (Tab.1). Sie variieren in ihrer Grösse zwischen 25 000 und rund 700 000 Dalton und machen gesamthaft rund 15% der Globulinfraction im Serum aus. (Literaturübersichten: 2,3,5,7,8,14,22,61,64,78,102,112)

Tab. 1: Die Proteine des Komplementsystems

Komponenten

5 Enzyme:	C1r, C1s, C2, B, D
8 Nicht-Enzyme:	C1q, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9

Regulatoren

2 Enzyme:	C3bINA (I), SCPB
6 Nicht-Enzyme:	C1INH, B-1H (H), C4bp, P, C6bp, S-Protein

Dreizehn dieser Proteine werden als Komponenten bezeichnet. Sie sind für die eigentlichen Funktionen des Systems verantwortlich. Zusätzlich zu den Komponenten gehören 8 Regulatorproteine zum Komplementsystem. Sie haben die Funktion, die Komplementaktivität zu kontrollieren und das System vor Überschiessender oder spontaner Aktivierung zu bewahren. Fünf der Komponenten und zwei Regulatoren sind proteolytische Enzyme.

Es darf heute mit einiger Sicherheit angenommen werden, dass die Liste bezüglich der Komponenten vollständig ist. Ebenso sicher ist aber auch anzunehmen, dass noch nicht alle Regulatorproteine bekannt sind und dass in den nächsten Jahren wahrscheinlich noch weitere gefunden werden.

Die meisten Komponenten kommen im Serum als inaktive Vorstufen vor und Aktivierung ist die Bezeichnung für die Reaktionen, die diese Vorstufen Teil eines integrierten Systems werden lassen.

Mit C1 bis C9 werden die klassischen Komplementkomponenten bezeichnet. Es sind dies die Komponenten, die für die Lyse der Erythrozyten benötigt werden.

Faktor B, Faktor D und Properdin (P) sind die Proteine des alternativen Reaktionsweges.

Ein Strich über einer bestimmten Komponente (z.B. $\overline{C1}$) heisst, dass diese Komponente aktiviert und in der Regel enzymatisch aktiv ist.

Ein "i" nach einer bestimmten Komponente (z.B. C3bi) steht für den inaktiven Zustand einer vorher aktiven Komponente.

Die Fragmente einer enzymatisch gespaltenen Komponente werden mit den Kleinbuchstaben a und b gekennzeichnet. Dabei ist a in der Regel das kleinere und b das grössere Bruchstück. Die weiteren Bruchstücke werden mit den Kleinbuchstaben c, d, e, f, etc. bezeichnet.

Den Subkomponenten von C1 werden aus historischen Gründen die Buchstaben q, r und s zugeordnet.

Auf die Nomenklatur der Regulatorproteine wird bei der Besprechung ihrer Funktion eingegangen.

c. Die Aktivierung des Komplementsystems

Das Komplementsystem lässt sich in vier verschiedene funktionelle Untereinheiten unterteilen. Diese Unterteilung ist schematisch in Abbildung 1 dargestellt. Drei dieser Untereinheiten führen letztlich zur Aktivierung von C3 und damit zur Bildung von C3b. Der klassische und der alternative Reaktionsweg können dies auf direktem Wege tun. Ist C3b einmal gebildet, so führt es zusammen mit den Proteinen des alternativen Reaktionsweges zu einer Verstärkung der C3 Aktivierung. Diese drei Aktivierungswege führen zu einem gemeinsamen Effektormechanismus. Dieser beginnt mit der enzymatischen Spaltung von C5 und in der Folge von C6 bis C9 und endet mit der Lyse von Bakterien oder Zellen.

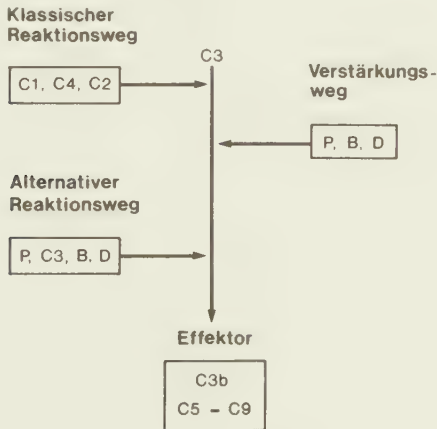


Abb. 1: Schematische Aufteilung des Komplementsystems in die vier Untereinheiten



Im folgenden werden diese vier Untereinheiten des Komplementsystems etwas genauer besprochen. Dies soll allerdings nur soweit erfolgen, wie dies für das Verständnis der Funktionen des Systems notwendig ist. Die biochemischen Einzelheiten dieser Reaktionen sind in mehreren neueren Übersichtsreferaten im einzelnen ausgeführt und es wird für ein ausführlicheres Studium darauf verwiesen (2,3,8,61,78,102,112,136,141).

Der klassische Reaktionsweg:

Der klassische Komplementreaktionsweg ist in Abb. 2 schematisch dargestellt. Er wird in der Regel durch Antigen-Antikörper-Komplexe (Ag-Ak-Komplexe) in Gang gesetzt. Durch Bindung von Antikörpern der Immunglobulin G oder M Klasse, nicht aber von IgA, D oder E, kommt es zu einer strukturellen Veränderung in der CH₂-Domäne der schweren Kette. Dadurch werden C1q und in Gegenwart von Calcium (Ca) auch C1r und C1s gebunden. Aktiviertes C1 ist als Protease in der Lage, C4 und in Gegenwart von Magnesium (Mg) C2 in je zwei Bruchstücke zu spalten. C4b und C2a werden an den Immunkomplex gebunden, während C4a und C2b (die übrigen Teile der ursprünglichen Moleküle) in die Umgebung abgegeben werden. Der Immunkomplex mit gebundenem C4b2a ist die C3-Konvertase des klassischen Reaktionsweges.

(Literaturübersichten: 14,23,38,64,112,114,135,173)

Neben Immunkomplexen sind auch der Lipid A-Teil des Lipopolysaccharids gram-negativer Bakterien (53,109,131) und DNS-Lysozym Komplexe (78) in der Lage, den klassischen Reaktionsweg in Gang zu setzen. Zusätzlich zu diesen Substanzen wird dieselbe Eigenschaft auch synthetischen Polynukleotiden, dem Protein A von Staphylokokken, C-reaktivem Protein, Plasmin und Trypsin zugeschrieben (78).

Konvertase und nach Stabilisierung durch aktiviertes Properdin funktioniert er auch als C5-Konvertase des alternativen Reaktionsweges.

(Literaturübersichten: 4,14,23,38,64,111,114,115,156)

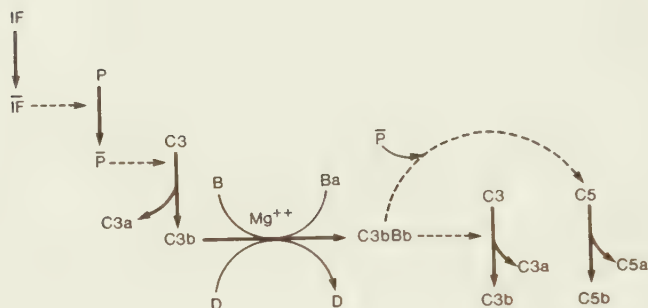


Abb. 3: Der alternative Reaktionsweg der Komplementaktivierung

Die zahlreichen und in ihrer Natur recht unterschiedlichen Substanzen, die in der Lage sind, diesen alternativen Reaktionsweg in Gang zu setzen, sind in Tab.2 zusammengestellt (26,109,146). Es gilt allerdings als sicher, dass diese Substanzen nicht alle auf dem oben beschriebenen Weg die Komplementkaskade in Gang setzen. Die Enzyme Plasmin, Trypsin und Pronase jedenfalls sind in der Lage, den oben beschriebenen Weg abzukürzen (71).

Tab. 2: Substanzen, die zur Aktivierung des Komplementsystems führen

Klassischer Reaktionsweg	Alternativer Reaktionsweg
IgM	Aggregierte Immunglobuline
IgG	Lipopolysaccharide
Protein A	Zymosan
C-reaktives Protein	Cobra venom factor
Polyanionen	Proteolytische Enzyme
Polykationen	Karzinomzellen
Proteolytische Enzyme	Epstein-Barr Virus
Endotoxin (Lipid A)	Infizierte B-Zellen
Gewisse RNA-Viren	Inulin
Konglutinin	Röntgenkontrastmittel
etc.	etc.

Der Verstärkungsmechanismus des Komplementsystems:

Der Feed back oder Verstärkungsmechanismus ist ebenfalls in Abbildung 3 dargestellt. Die seltsame Konstellation, dass das aktivierte Substrat (C3b) seinerseits wieder Teil des Aktivators ist, macht es möglich, dass C3b in Gegenwart von Faktor B und D neue C3-Konvertase produziert. Dieser Rückkopplungsmechanismus führt in der Folge, wenn C3b einmal gebildet ist, zu einer lawinenartigen Aktivierung des Systems. Dieser Verstärkungsmechanismus wird aktiv unabhängig davon, ob C3b auf dem klassischen oder alternativen Weg gebildet wurde. Dies heisst, dass eine Komplementaktivierung auf dem klassischen Weg immer auch zur Aktivierung des alternativen Reaktionsweges führt. Es wird deshalb angenommen, dass der klassi-

sche Reaktionsweg phylogenetisch jünger ist und nur dazu dient, den Mechanismus rascher in Gang zu setzen (64).
(Literaturübersichten: 4,14,23,64,114,115,156)

Der Effektor- oder Membran-Schädigungs-Mechanismus:

Wie aus Abbildung 4 ersichtlich ist, verlaufen die beiden Reaktionswege nach der Bildung der C5-Konvertase gemeinsam.

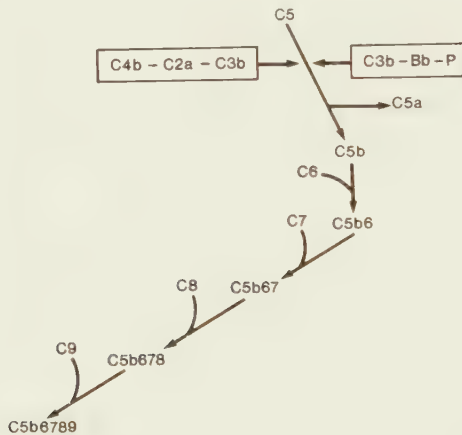


Abb.4: Der Membran-Schädigungs-Mechanismus des Komplementsystems

Die terminalen Reaktionen beginnen mit der enzymatischen Spaltung von C5 in die beiden Bruckstücke C5a und C5b. Letzteres wird an einer neuen Bindungsstelle an die Oberfläche des Aktivators fixiert. Damit ist der Weg bereitet für die Bindung der Komponenten C6 bis C9. Diese Vorgänge beruhen, im Gegen-

satz zu den früheren Reaktionen, nicht mehr auf enzymatischen Abläufen. Die eigentliche Lyse der Zelle wird durch C8 und C9 bewerkstelligt. Der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht geklärt. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass die Bindung der terminalen Komponenten zur Bildung von Löchern in der Zellwand führt und es scheint, dass dies durch chemische Reaktionen mit Zellwandproteinen und Phospholipiden geschieht (106,114,167). Sind diese Löcher einmal gebildet, so kommt es rasch zu einem Ionenaustausch und in der Folge zum Zelltod.

Die Regulationsproteine des Komplementsystems:

Die potentiellen biologischen Folgen einer ungehinderten Komplementaktivierung erfordern ein ausgefeiltes Regulationssystem. Andernfalls würden die Aktivierungsmechanismen ablaufen, bis die einzelnen Komponenten vollständig aufgebraucht sind. Diese Kontrollfunktion wird, soweit dies bis heute bekannt ist, durch sechs Proteine wahrgenommen. Sie werden gemäß ihrer Funktion in Inaktivatoren und Inhibitoren unterteilt. Inaktivatoren sind in der Regel Enzyme, die zur proteolytischen Zerstörung der Primärstruktur einer bestimmten Komponente fähig sind. Inhibitoren dagegen werden an eine bestimmte Komponente gebunden und machen diese dadurch Serumenzymen zugänglich oder sie verhindern durch Bindung an den reaktiven Teil der Komponente den weiteren Reaktionsablauf durch stöchiometrische Behinderung (14,42,64).

Der klassische Reaktionsweg wird kontrolliert durch den C1-Inhibitor (C1INH). Er bindet an die aktivierte erste Komponente und verhindert dadurch die Aktivierung von C4 und C2. C1INH ist ein normaler Bestandteil der α_2 -Globulinfraktion im Serum. Er ist empfindlich für Säure und Hitze und wird bei pH-Werten unter 6 und bei Temperaturen über 60 C inaktiviert (14,42,64). Beim Menschen ist ein Mangelsyndrom als angio-neurotisches Oedem (HANE) bekannt (105,140).

Der C3b-Inaktivator (C3bINA oder I) ist ein β -Globulin mit einem Molekulargewicht von 93 000 (14). Er spaltet die Kette von gebundenem oder freiem C3b. Dadurch gehen alle biologischen Funktionen des gesamten Moleküls verloren und der verbleibende Teil wird dem enzymatischen Abbau durch andere Serumproteasen zugänglich (42,64). Ein Fehlen von C3bINA führt zu einem Abfall von C3 und Faktor B, da beide durch den unkontrollierten Ablauf des Verstärkermechanismus verbraucht werden (105). C3bINA ist wahrscheinlich auch in der Lage, C4b zu inaktivieren (64).

β -1H oder Faktor H ist ebenfalls ein β -Globulin. Sein Molekulargewicht beträgt 150 000 und seine Funktion ist die Inaktivierung von C3b zusammen mit C3bINA (14,23,42,64). Weder C3bINA noch Faktor H sind allein in der Lage, den Verstärker- oder Feed back-Mechanismus zu kontrollieren. Nur ihr Zusammenwirken macht dies möglich.

Die Serumkarboxipeptidase B (SCPB) wird auch Anaphylatoxin Inaktivator genannt. Sie spaltet C3a und C5a, die beiden kleineren Spaltprodukte der C3- und C5-Aktivierung, durch enzymatische Abtrennung der terminalen Aminosäuren (130,184). Die Frage ist noch offen, ob die SCPB mit dem Inaktivator der chemotaktischen Faktoren identisch ist oder nicht (42,184).

Das C4-Bindungsprotein (C4bp) wurde erst kürzlich beschrieben und ist wahrscheinlich Kofaktor bei der C4b-Inaktivierung durch C3bINA (14,23,64).

Das S-Protein verhindert die Bindung des Membran-Schädigungs-Mechanismus durch Konkurrenz um die Bindungsstelle an C5b (14,23,64).

d. Biologische Aktivitäten des Komplementsystems

Nach der Besprechung der einzelnen Reaktionsschritte der Komplementaktivierung sollen in diesem Kapitel die biologischen Funktionen einiger Aktivierungsprodukte besprochen werden.

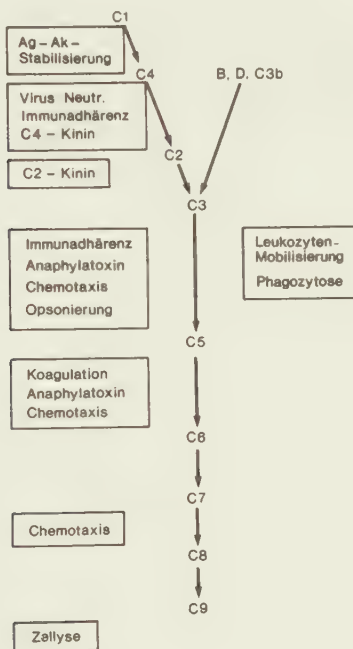


Abb.5: Biologische Funktionen der Komplementaktivierung

Für lange Zeit wurden die frühen Beobachtungen bezüglich bakterizider und hämolytischer Aktivität als die eigentliche Funktion der Aktivierung des Komplementsystems angesehen.

Andere Aktivitäten wurden zwar vermutet aber lange Zeit nicht ernsthaft untersucht. Dies hat sich in den letzten Jahren grundlegend geändert. In einer Vielzahl von Untersuchungen wurde die Bedeutung von Komplement für die Immunität und seine Rolle in der Immunpathologie abgeklärt (7,39,62,91,113,158, 192,193). Auf Grund dieser Untersuchungen ist man heute weitgehend der Ansicht, dass dem lytischen Effekt auf Bakterien und Erythrozyten nur untergeordnete oder fast nebensächliche Bedeutung zukommt (62). Abbildung 5 zeigt den schematischen Ablauf der Komplementaktivierung zusammen mit den wichtigsten bekannten biologischen Funktionen, die aus jedem einzelnen Schritt resultieren. Es ist daraus ersichtlich, dass insbesondere durch die Aktivierung von C3 und C5 einige wichtige Mechanismen wie Opsonierung, Chemotaxis und Produktion von Anaphylatoxinen in Gang gesetzt werden.

In Tabelle 3 sind die einzelnen aktivierten Komponenten und deren biologische Effekte zusammenfassend dargestellt. Diese Zusammenstellung erhebt keineswegs Anspruch auf Vollständigkeit, denn die Erforschung der biologischen Bedeutung von Komplement ist noch in vollem Gange und bei weitem nicht abgeschlossen. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass eine Zusammenstellung von Komplementaktivitäten in kurzer Zeit anders aussehen wird. Ungeachtet dieser lückenhaften Kenntnisse soll im folgenden auf einige der für das Mastitisgeschehen potentiell bedeutenden Effekte näher eingegangen und diese von einem funktionellen Gesichtspunkt aus besprochen werden.

Tab.3: Biologische Funktionen aktivierter Komplementkomponenten (8,14,31,124,125,171)

Komponente	Funktion
C1	Stabilisierung von Immunkomplexen
C2b	Kinin-ähnliche Aktivität
C4a	Serotoninfreisetzung
C4b	Virusneutralisation
	Immunadhärenz
C3a	Anaphylatoxin, Chemotaxin
C3b	Opsonin, Immunadhärenz, Phagozytose, Auflösen von Immunkomplexen, Freisetzung von Thrombozyten Faktor 3,
C3e	Mobilisation von Leukozyten aus Knochenmark
C5a	Chemotaxin, Anaphylatoxin
C5b	Opsonin, Immunadhärenz (Thrombozyten)
C5b67	Chemotaxin
C8,C9	Bakteriolyse, Hämolysse, Zellyse

Anaphylatoxine:

Anaphylatoxine sind kleinmolekulare biologisch aktive Peptide, die definitionsgemäss auf kleine Blutgefässe, glatte Muskulatur, Mastzellen und Leukozyten einwirken. Es war zwar seit langer Zeit bekannt, dass durch Zugabe von Immunkomplexen oder Polysacchariden zu frischem Serum solche toxischen Substanzen produziert wurden, erst 1959 jedoch zeigten OSLER et al.(127), dass diese anaphylatoxische Aktivität durch Akti-

vierung des Komplementsystems geschaffen wurde. In der Folge wurde dann diese Aktivität sehr bald den beiden kleineren Spaltprodukten C3a und C5a der C3- und C5-Aktivierung zugeordnet. Beide sind extrem aktive Peptide und spielen eine Schlüsselrolle in den meisten akut-entzündlichen Reaktionen (71,134,186). Obwohl sie in ihrer Struktur sehr ähnlich sind, sind die Reaktionen spezifisch für jedes der beiden Peptide. Dies bedeutet, dass sie unterschiedliche Rezeptoren oder Angriffspunkte haben. Dennoch blockieren Antihistamine immer die Wirkung beider Komponenten. Erst kürzlich hat sich auch gezeigt, dass C4a ebenfalls, wenn auch nur in geringem Masse, anaphylatoxische Eigenschaften zukommen (68).

Sowohl C3a wie C5a führen letztlich zu einer Kontraktion glatter Muskelzellen, zur Erhöhung der Gefäßpermeabilität und zur Degranulation von Mastzellen und damit zur Freisetzung von Histamin (41,71,186). Damit erfüllen sie wichtige Funktionen bei der frühen Mobilisation der Abwehr im Falle einer Erregerinvasion und sind damit Bestandteil der Immunmechanismen im weiteren Sinne. Noch nicht völlig geklärt ist die biologische Bedeutung ihrer Fähigkeit zur Stimulierung von Leukozyten (71).

Chemotaxine:

Chemotaxine oder chemotaktische Faktoren, wie sie auch genannt werden, sind Substanzen, die die Migration von Leukozyten bewirken. Im Verlaufe der Komplementaktivierung werden wahrscheinlich drei verschiedene Chemotaxine gebildet. Mit Abstand am wichtigsten und effektivsten ist C5a, während C3a und C5b67 offenbar nur von sekundärer Bedeutung sind (15,55,71,82,93,163,164,165,187).

C5a ist das kleinere Bruchstück der C5-Spaltung durch die C5-Konvertase des alternativen oder des klassischen Reaktionsweges. Mit einem Molekulargewicht von 12 500 macht es rund 7%

des ganzen C5-Moleküls aus (14,184). Seine Aminosäurezusammensetzung und die Sequenz wurden kürzlich beschrieben (32,114). Das C-terminale Ende des Peptids ist für seine Aktivität als Chemotaxin verantwortlich (41,130,186) und die enzymatische Abspaltung des terminalen Arginin führt zur Inaktivität des Moleküls (55,186). C5a ist ein biologisch ausserordentlich aktives Peptid und selbst in Konzentrationen von 10^{-11} M pro Liter wirkt es noch chemotaktisch für Granulozyten (55,82).

Die Interaktion von C5a mit neutrophilen Granulozyten wurde im Verlaufe der letzten Jahre ausführlich untersucht (15,32,55,89,188,189). Es hat sich dabei gezeigt, dass Rezeptoren für C5a in der Zellmembran von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten vorhanden sind (17,66). Pro Zelle sind zwischen 20 000 und 100 000 solcher Rezeptoren gefunden worden. Nach Bindung von C5a an den Rezeptor kommt es zu einem Fluss von Kationen (speziell Kalzium) durch die Zellmembran (15). Dieser Kalziumaustausch zusammen mit der Formation von Aktin-Filamenten in der Umgebung, wo C5a gebunden ist, führt zu einer kontraktilen Antwort der Zelle.

Gebundenes C5a wird rasch in die Zelle aufgenommen und es stimuliert dort die Freisetzung lysosomaler Enzyme und den oxidativen Metabolismus.

Mit Hilfe der Rezeptoren sind die Zellen in der Lage, einen Konzentrationsgradienten wahrzunehmen und sich in der Folge in Richtung höherer Konzentrationen aktiv zu bewegen (32,89,164). Damit führt die Bildung chemotaktischer Faktoren zu einer Zellmigration an den Ort der Komplementaktivierung. Diese Zellansammlung ihrerseits wird als eines der wichtigsten Ereignisse in der frühen Erregerabwehr angesehen (15,164).

Opsonierung:

Opsonine sind definitionsgemäss Substanzen oder Serumfaktoren, die die Phagozytose erleichtern oder beschleunigen. Diese funktionelle Definition von WRIGHT und DOUGLAS stammt aus dem Jahre 1903 (139) und hat sich praktisch unverändert bis heute gehalten. Erst in neuester Zeit wird Opsonierung auch von einem biochemischen oder immunologischen Gesichtswinkel gesehen und es zeigte sich dabei, dass Opsonierung identisch ist mit der Bindung von Antikörpern der IgG Klasse und von einzelnen Komplementkomponenten an die Oberfläche eines Erregers oder Partikels (17,33,49,60,62,70,117,178).

Die Aktivierung von C3 und die Bindung von C3b an den Erreger ist der bedeutendste Beitrag des Komplementsystems zur Opsonierung (17). Allerdings führt auch die Bindung von C5b zu einer Stimulation des Phagozytoseprozesses, ist jedoch quantitativ nur von ganz untergeordneter Bedeutung (17).

Die Opsonine schaffen den Kontakt zwischen dem Erreger und der phagozytierenden Zelle durch Bindung an Rezeptoren für IgG und C3b in der Zellmembran der Phagozyten (16,18,95). Durch diese Brückenbildung wird einerseits ein stabiler Kontakt geschaffen zwischen Erreger und Phagozyt und andererseits induziert die Bindung wahrscheinlich auch die Bildung des Phagosoms (17,95,159).

Die genauen Informationen über die Opsoninfunktion von Komplement wurden vor allem aus Experimenten mit Erythrozyten erhalten (60,123). Dabei konnten die Erythrozyten relativ klar definierte Reaktionen mit einzelnen Komponenten oder Kombinationen eingehen und der Einfluss dieser definierten Serumproteine wurde anschliessend in Phagozytoseexperimenten abgeklärt. Solche definierten Untersuchungen wurden mit mikrobiellen Systemen kaum durchgeführt (179,198). Die vorhandenen Berichte differieren denn auch erheblich bezüglich der Ergebnisse und Schlussfolgerungen. Die meisten zeigen zwar, dass

Antikörper und/oder Komplement notwendig sind für eine ausreichende Opsonierung, aber es ist in der Regel nicht klar, ob die Immunglobuline als Opsonine im Sinne von Liganden oder als Komplementaktivatoren wichtig sind (33,37,58,74,107,168,178, 191). Auch die antiphagozytären Eigenschaften und Möglichkeiten von Erregern sind erst kürzlich mit Opsonierung und Komplement in Verbindung gebracht worden (46,50,79,117,123, 153,176,177,183).

In den Experimenten von PETERSON und QUIE (131) hat sich gezeigt, dass *E. coli* ohne Kapsel (K-) auch in Abwesenheit von Antikörpern vollständig opsoniert werden mit C3b, das auf dem alternativen Reaktionsweg aktiviert wurde. Erreger mit Kapsel (K+) dagegen werden in Abwesenheit von Antikörpern nicht mit C3b opsoniert. Die Zellwand von K+ Bakterien ist offenbar durch die Kapsel geschützt und damit der Komplement vermittelten Opsonierung via den alternativen Reaktionsweg nicht zugänglich (153,175,177). Diese Erreger benötigen Antikörper induzierte Komplementaktivierung via den klassischen Reaktionsweg für C3b-Fixation. Da in diesen Experimenten IgG und IgM zu identischer C3b-Fixation und Phagozytose führten, ist anzunehmen, dass IgG nur als Komplementaktivator und nicht als Ligand fungierte. Zu ähnlichen Schlussfolgerungen kamen auch andere Untersucher, die feststellten, dass agammaglobulinämisches Serum nicht zur Opsonierung von Bakterien und LPS-beschichteten Erythrozyten mit C3b führte (72,79,138). Auch bei *Staph. aureus* wurde beobachtet, dass die Erreger nicht ausreichend opsoniert und phagozytiert werden, wenn der klassische Reaktionsweg mittels Mg-EGTA gehemmt wird (58). In den neuesten Untersuchungen wird sogar die Vermutung geäußert, dass ausschliesslich die Bindung von C3b für den Phagozytose-Prozess von Bedeutung sei (1,16,33,76,77,79,80,96,159,176).

Im Gegensatz zu diesen Berichten stehen die Ergebnisse einer ganzen Anzahl von Autoren, die fanden, dass Aktivität via den alternativen Reaktionsweg ausreichend ist für die C3b

Fixation an die Oberfläche gram-negativer Bakterien, *Cryptococcus neoformans*, Zymosan und *C. albicans* (43,58,73,74,76). Die Inkubation von Lipopolysaccharid von *V. alkalescens* in C2-freiem Serum führte zur Spaltung von C3 (107). C2- und C4-freies Serum opsonierte *E. coli*, *E. coli*-LPS und *C. albicans* zwar langsamer aber praktisch gleich gut wie normales Serum (46). Die Blockierung des klassischen Reaktionsweges mit Mg-EGTA führte ebenfalls zu vollständiger Opsonierung von *Yersinia enterocolitica* (1), *E. coli* und Shigellen (16). Auch Clq-freies Serum war in der Lage, *E. coli* zu opsonieren (46). Properdin und Faktor B waren notwendig für die Bindung von C3b an Pseudomonaden und für die maximale Opsonierung von Shigellen (46).

Diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse beruhen sicher zum Teil auf Unterschieden in der Versuchsanlage und der Methoden zur Bestimmung der Opsonierung. Sie lassen aber auch den Schluss zu, dass die Opsonierung offenbar nicht bei allen Erregern gleich abläuft. Insbesondere das Fehlen bzw. das Vorhandensein einer Kapsel scheint entscheidend zu sein, ob ein Erreger unter bestimmten Umständen opsoniert wird oder nicht.

2. Der Phagozytose-Prozess

Bei weitem das wichtigste Element in der Resistenz gegen Infektionskrankheiten und in der Abwehr eindringender Erreger ist ein funktionierendes Phagozytosesystem (34,185). Dies wird durch die Schwere aller Krankheiten, die mit einer Insuffizienz phagozytischer Zellen einhergehen, unterstrichen (38,108).

Grundsätzlich lassen sich zwei Arten phagozytischer Zellen unterscheiden. Es sind dies die Granulozyten einerseits und die mononukleären Phagozyten andererseits. Die relative

Bedeutung der beiden Zellgruppen variiert mit dem zu bekämpfenden Erreger (77). Neutrophile Granulozyten sind vor allem zuständig für die Abwehr obligat extrazellulärer Mikroorganismen, die ihrer Natur gemäss vorwiegend akute Infektionen verursachen. Die mononukleären Phagozyten scheinen grössere Bedeutung zu haben in der Bekämpfung fakultativ oder obligat intrazellulärer Organismen, die vorwiegend Ursache chronischer Infektionen sind (34).

In den folgenden Ausführungen soll nur noch die Phagozytose durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten besprochen werden, da diese Zellart im Mastitisgeschehen und in der Abwehr eindringender Erreger die überragende Rolle spielt.

Neutrophile Granulozyten werden nach einer ungefähr zweiwöchigen Reifung im Knochenmark in die Zirkulation abgegeben. Während dieses Reifeprozesses entstehen die azurophilen oder primären und die spezifischen oder sekundären Granula im Zytoplasma (180,185). Diese Granula enthalten eine ganze Reihe von Enzymen und Proteinen, die für die antimikrobielle Aktivität und für die entzündlichen Reaktionen verantwortlich sind. Als wichtigste seien nur die Myeloperoxidase (primäre Granula) und Laktoferrin und Lysozym (sekundäre Granula) genannt (30,126).

Während der Reifung der Granulozyten treten auch Veränderungen in ihrer Zellmembran auf und es kommt zur Bildung von Mikrofilamenten, die für die spätere Motilität der Phagozyten von Bedeutung sind (180).

Der eigentliche Phagozytose-Prozess lässt sich in vier unterschiedliche Phasen unterteilen. Der Erkennung eindringender Mikroorganismen folgt die Kontaktnahme. Die dritte Phase besteht in der eigentlichen Einverleibung des Erregers in die Zelle und darauf folgt dann die letzte Phase mit dem Abtöten des Erregers.

Die Erkennung einer mikrobiellen Invasion durch Granulo-

zyten beruht einerseits auf bakteriellen Substanzen, die direkt chemotaktisch aktiv sein können (19,53). Häufiger und effektiver ist jedoch der Umweg über die Komplementaktivierung und damit verbunden die Bildung von C5a. Dieses Peptid ist die wichtigste chemotaktische Substanz für Granulozyten.

Vorgängig zur eigentlichen Phagozytose müssen phagozytierende Zelle und Erreger miteinander in Kontakt treten (34,66). Dieser notwendige stabile Kontakt wird mittels Brückenbildung durch die Opsonine bewerkstelligt (16,73,81,159).

Die Mechanismen, wie die Erreger in der dritten Phase in die Zelle einverleibt werden, sind wahrscheinlich analog denen, die von GRIFFIN und SILVERSTEIN (70) in ihren Experimenten mit Makrophagen beschrieben wurden. Sie demonstrierten, dass die Aufnahme in die Zelle nicht ein ja oder nein Phänomen ist, das durch die Bindung von Opsoninen ausgelöst wird. Die Einverleibung erforderte eine kontinuierliche Interaktion zwischen den Opsoninen, die regelmässig über den Erreger verteilt sein müssen, und den Rezeptoren in der Zellmembran der phagozytierenden Zelle. Dadurch umfließt die Zelle den Erreger vollständig, fusioniert und bildet so das Phagosom (34,165). Auch die Art der Opsonine scheint für diese Aufnahme in die Zelle von Bedeutung zu sein (74,159,182) und die neuesten Untersuchungen weisen darauf hin, dass vor allem oder gar ausschliesslich die Fixation von Komplement für den Phagozytose-Prozess ausschlaggebend ist (16,79).

Die vierte Phase des Phagozytose-Prozesses spielt sich innerhalb des Granulozyten im Phagosom ab (150). Durch die Bildung des Phagosoms werden weitere Reaktionen in Gang gesetzt. Zwei davon sind von besonderer Bedeutung. Zum einen fusionieren die zytoplasmatischen Granula der Zelle mit der Membran des Phagosoms und geben die in ihnen enthaltenen Substanzen ins Phagosom ab. Dieser komplizierte und nicht völlig geklärte Vorgang wird als Degranulation bezeichnet (34). Die zweite Reaktion, die sich im Phagosom abspielt,

umfasst die Bildung toxischer Produkte der Sauerstoffreduktion. Sie entstehen beim Ablauf einer ganzen Serie normalerweise nicht aktiver metabolischer Reaktionen. Diese werden unter dem Begriff "Respiratory Burst" zusammengefasst. Im Falle der Granulozyten umfassen sie die folgenden Veränderungen:

- Steigerung des O_2 -Verbrauchs (108)
- Erhöhung der Aktivität des Hexose-Monophosphat Shunt (108)
- Gesteigerte Produktion von Superoxid-Anionen und H_2O_2 (6,74,88)
- Steigerung der Bindung von anorganischem Jod an Protein (150)
- Lichtemission (Chemilumineszenz) (51,76,88,155,166)

Das eigentliche Abtöten und der Abbau der Erreger im Phagosom erfolgt durch die gemeinsame Aktion von Granulainhalt und oxidierenden Produkten des Respiratory Burst. Die Reaktionen im Einzelnen sind kürzlich in mehreren Monographien ausführlich beschrieben worden (6,54,66,100,150). Es wird deshalb darauf verzichtet, an dieser Stelle auf diese Vorgänge genauer einzugehen. Obschon die oben erwähnten Reaktionen auch in Abwesenheit von Komplement ablaufen, hat sich bei allen diesen Untersuchungen einheitlich gezeigt, dass ihr Ausmass in Anwesenheit von Komplement sehr stark gesteigert wird (16,51,96,97).

3. Das Komplementsystem des Rindes

Obschon die Präsenz von Komplement und seine Beteiligung an der bakteriolytischen Aktivität im Serum des Rindes seit langer Zeit bekannt war (170), sind nur relativ wenige Versuche unternommen worden, diese Aktivität direkt in einem hämolytischen System zu messen. Dies ist wohl hauptsächlich darauf

zurückzuführen, dass während vieler Jahre angenommen wurde, dass Rinderkomplement keine hämolytische Aktivität besitze (28,30,143,170). Diese Auffassung wurde erst geändert durch die Untersuchungen von RICE und DUHAMEL (148) und von BARTA et al. (10). Sie zeigten, dass bovines Komplement zwar nicht zur Hämolyse von Schaf-Erythrozyten, sensibilisiert mit Kaninchenantikörpern, führt, dass jedoch Kaninchen- und Meerschweinchen-Erythrozyten hämolysiert werden. Heute gilt das System mit Meerschweinchen-Erythrozyten, sensibilisiert mit natürlichen Antikörpern des Rindes, als die Methode der Wahl zur Bestimmung hämolytischer Komplementaktivität beim Rind (9,12).

Im Laufe der Jahre wurden dann auch alle einzelnen Komponenten des klassischen Reaktionsweges von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen (11,45,98,99,174,196). Später folgte auch die Demonstration des alternativen Reaktionsweges (129,145,169,174) und der Nachweis der Faktoren B und D des alternativen Weges (169). Von den Kontrollproteinen sind bislang der C1-Inhibitor und der C3b-Inaktivator gefunden worden (11,98,99,174). Grundsätzlich weisen alle bisherigen Untersuchungen darauf hin, dass das Komplementsystem des Rindes gleich aufgebaut ist wie dasjenige des Menschen und anderer Säugetiere. Unterschiede bestehen offenbar nur in der Austauschbarkeit einzelner Komponenten mit denjenigen anderer Tierarten (13,69,104).

Hämolytische Aktivität konnte auch bereits bei 90 Tage alten Föten regelmässig nachgewiesen werden und es hat sich gezeigt, dass diese Aktivität bis zum Geburtszeitpunkt sukzessive ansteigt (40,63). Allerdings liegen die Serumkonzentrationen zum Geburtszeitpunkt noch immer deutlich tiefer als bei erwachsenen Tieren und die Werte fallen in den ersten Lebenstagen zudem nochmals deutlich ab (40,120,144).

Untersuchungen über die Beteiligung des Komplementsystems bei natürlichen Erkrankungen des Rindes sind nur auf zwei Gebieten durchgeführt worden. Im Verlaufe experimenteller

Infektionen mit Trypanosomen wurde ein dramatischer Abfall der hämolytischen Aktivität im Serum gemessen, der mit grosser Wahrscheinlichkeit auf einen übermässigen Verbrauch zurückgeführt werden musste (154,161). Bei Rindern, die experimentell einer restriktiven Fütterung bezüglich Protein- und Energieaufnahme unterworfen wurden, zeigte sich nur ein geringer, relativ kurzfristiger und biologisch vermutlich unbedeutender Abfall der hämolytischen Aktivität im Serum (194,195).

Eine Beschreibung des Komplementsystems des Rindes wäre nicht vollständig ohne die Erwähnung von Konglutinin. Es ist allerdings nicht klar, ob Konglutinin überhaupt zum Komplementsystem zu zählen ist. Es ist eine ungewöhnliche Substanz, die nur im Serum des Rindes gefunden wird und bislang bei keiner anderen Tierart nachgewiesen werden konnte.

Es war schon vor 70 Jahren bekannt, dass das Rinderserum eine Substanz enthält, die Erythrozyten agglutiniert, nachdem diese Komplement fixiert hatten, aber erst viel später wurde klar, dass diese Substanz mit aktiviertem und gebundenem C3 reagierte und sich wie ein Antikörper gegen C3 verhielt (92). Heute ist jedoch sicher, dass Konglutinin kein Immunglobulin, sondern ein Polysaccharid ist und sich damit von Immun-Konglutinin, das beim Menschen und allen Tierarten vorkommt, unterscheidet (92). Seine biologische Funktion ist völlig unklar und die Hypothesen reichen von Agglutination von Immunkomplexen bis zur Kontrolle der Komplementaktivierung.

Die spezifische Affinität von Konglutinin für gebundenes und aktiviertes, nicht aber freies C3 ist es, die zu seiner Verwendung in der Diagnostik von Immunkomplexkrankheiten beim Menschen geführt hat (52). Es ist denn auch eine ganze Reihe hochempfindlicher Tests für den Nachweis zirkulierender und Komplement aktivierender Immunkomplexe in die Diagnostik eingeführt worden. Für ausführlichere Informationen über Isola-

tion, chemische und physikalische Eigenschaften und immunologische Reaktionen wird auf die ausführliche Monographie von LACHMANN verwiesen (92).

4. Komplement in der Milchdrüse des Rindes

Ueber die Präsenz und Aktivität von Komplement in anderen Körperflüssigkeiten als Blutserum liegen nur sehr spärliche Informationen vor (21,45,54), obschon der erste Bericht über hämolytische Aktivität in der Milch bereits im Jahre 1908 veröffentlicht wurde (132). Für mehr als 50 Jahre erschien dann keine einzige Publikation mehr zu dieser Frage. Erst als die bakteriziden Eigenschaften der Milch das Interesse der Forschung weckten, wurden auch wieder Versuche unternommen, die Beteiligung von Komplement an diesem Prozess abzuklären. Mit Hilfe eines Konglutinintestes demonstrierten REITER und BROCK (143) und später auch andere (21,45) die Anwesenheit und Aktivität der frühen Komplementkomponenten bis C3. Da zu dieser Zeit die Ansicht, dass Rinderkomplement nicht hämolytisch aktiv sei, noch immer gültig war, wurde die Präsenz der ganzen Komplement-Kaskade meistens nur indirekt durch das Vorhandensein bakterizider Aktivität demonstriert (10,21,30, 142,143). Erst in neuester Zeit wurde es durch Verbesserungen in der Methodik der Komplementbestimmung möglich, mittels hämolytischer Systeme die Präsenz von Komplement in der Milch direkt nachzuweisen (21,48,119). Diese Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Normale Milch ist nur selten und in niedrigen Verdünnungen bakterizid für serumempfindliche gram-negative Bakterien (27,28,143).
2. Serumresistente Erreger werden von normaler Milch nicht lysiert (27,28).
3. Milchserum aus akut erkrankten Vierteln ist immer bakterizid für serumempfindliche, nicht aber für serumre-

sistente Erreger (28,30).

4. Die Blockierung des klassischen Reaktionsweges durch Mg-EGTA führt zu einem Verlust der bakteriziden Aktivität (21,29,30).

5. Hämolytische Aktivität für Meerschweinchen- und Kaninchen-Erythrozyten ist in normaler Milch nicht nachweisbar (45,119).

6. Kolostrum enthält hämolytisches Komplement in niedrigen Konzentrationen (21,45,48,143).

Über die Konzentrationen einzelner Komponenten in der Milch liegen keine Untersuchungen vor.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Ablauf der Untersuchungen

Die Untersuchungen der Komplementaktivität in Blut- und Milchseren von Kühen und seine Bedeutung für die Abwehr von Infektionserregern spielte sich in vier Phasen ab.

In der ersten Phase war die von BARTA und BARTA (9) beschriebene Methode zur Bestimmung hämolytischer Aktivität zu modifizieren, so dass sie als Mikromethode in Mikrotiterplatten durchführbar war. Andernfalls wäre es kaum möglich gewesen, die grosse Zahl von Proben (ca. 3500) auf hämolytische Aktivität zu untersuchen. Für diese Anpassung an unsere Bedürfnisse war es notwendig, den Einfluss von pH, Pufferkonzentration, Inkubationszeit und Erythrozytenkonzentrationen auf die Hämolyse zu untersuchen und das Testsystem zu modifizieren. Die endgültige Methode, wie sie in den Tests zur Anwendung kam, ist in Anhang 1 ausführlich beschrieben.

Der zweite Teil der Untersuchungen umfasste die Bestimmung der hämolytischen Aktivität und der Komplement-C3-Konzentrationen in Milchseren von Kühen mit und ohne Mastitis. Experimentelle Mastitiden wurden induziert, um die zeitlichen Abläufe zu untersuchen.

Im dritten Teil wurde der Frage antikomplementärer Aktivität in verschiedenen Milchseren nachgegangen und der letzte Teil umfasst die Untersuchungen zur Komplementfixation durch verschiedene *E. coli* Stämme und ihre Bedeutung für den Phagozytose-Prozess.

2. Material und Methoden

Die Milchproben von Kühen mit akuten und chronischen Mastitiden wurden einerseits von Betrieben, die von der ambulatorischen Klinik des Tierspitals Zürich betreut werden, und andererseits von zwei Milchfarmen mit je 400 Kühen in der näheren Umgebung der School of Veterinary Medicine, University of California, Davis (USA), erhalten.

Alle Mastitisinduktionsexperimente und die Verlaufsuntersuchungen bei trockenstehenden und frisch laktierenden Kühen wurden an institutseigenen (Dept. of Clinical Pathology, UC Davis) Tieren durchgeführt.

Für die Mastitisinduktionsversuche wurde *E. coli* 026:B6 lipopolysaccharid B der Firma Difco Laboratories, Detroit Mi, (USA) verwendet.

Für die Komplementfixations- und die Phagozytoseversuche wurden die *E. coli* Stämme "Lilly" und "12795" und teilweise auch "S-16" und "2490" verwendet. Ihre Eigenschaften und ihr Verhalten gegenüber Serum wurden verschiedentlich untersucht und beschrieben (10,27,28). "Lilly" und "S-16" gelten als

serumempfindlich, die anderen beiden Stämme als serumresistent.

Die methodischen Einzelheiten für die Bestimmung der Serum-Albumin-Konzentration im Milchserum mittels Rocket-Immunelektrophorese sind in Anhang 2 und die Messung der Komplement-C3-Konzentration mittels radialer Immunodiffusion in Anhang 3 ausführlich beschrieben.

Anhang 4 erklärt die Gewinnung der Milchleukozyten und in Anhang 5 sind die technischen Einzelheiten der Bestimmung der Nitroblautetrazolium-Reduktion als Mass für die Phagozytose-Aktivität erklärt. Bei der Methode handelt es sich um eine Kombination und Modifikation zweier in der Literatur beschriebener Verfahren (107,152).

Der ELISA zur direkten Quantifizierung von fixiertem C3 an der Oberfläche von Erregern wurde im eigenen Labor ausgearbeitet und die Einzelheiten sind aus Anhang 6 ersichtlich.

3. Resultate

a. Komplementaktivität im Blutserum

Durch die verschiedenen Modifikationen des Verfahrens zur Bestimmung der hämolytischen Komplementaktivität war es in einer ersten Versuchsreihe notwendig, die Empfindlichkeit der Methode zu prüfen. Dazu wurden die Seren von 16 gesunden Kühen an acht verschiedenen Tagen bezüglich Aktivität des klassischen und des alternativen Reaktionsweges untersucht. Die methodischen Einzelheiten sind in Anhang 1 ausführlich beschrieben. Für die Bestimmung der Aktivität des alternativen Reaktionsweges wurde der klassische Weg mittels 10 mM EGTA und 4 mM $MgCl_2$ blockiert. Diese Behandlung der Seren und Puffer führt durch Bindung des vorhandenen Kalziums zur Blockierung

des klassischen Reaktionsweges. Der alternative Weg bleibt jedoch funktionsfähig, da für seine Aktivierung nur Mg, nicht aber Ca notwendig ist (21,56,57,58).

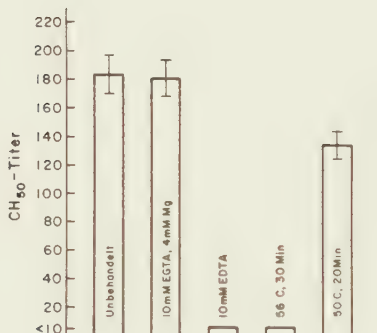


Abb. 6: Hämolytische Komplementaktivität (Mittel $\pm$ Standardabweichung) im Blutserum von 16 Kühen

Die Titer der gesamten Aktivität der insgesamt 128 Bestimmungen variierten zwischen 146 und 223 mit einem Mittel von 183.4 und einer Standardabweichung von 13.2. Eine fast identische Verteilung ergab sich bezüglich hämolytischer Aktivität via alternativen Reaktionsweg mit Werten zwischen 151 und 218, einem Mittel von 181.6 und einer Standardabweichung von 12.7. Erwartungsgemäss verhinderte die Chelierung von Ca und Mg durch Zugabe von 10 mM EDTA (55) ebenso wie die Erhitzung der Seren auf 56 C für 30 Minuten jegliche hämolyti-

sche Aktivität. Die Erhitzung auf 50 C während 20 Minuten führt zur Inaktivierung von Faktor B und damit selektiv zur Blockierung des alternativen Reaktionsweges (125). Nach Zugabe von Mg-EGTA ist in diesen Seren denn auch keine hämolytische Aktivität mehr nachweisbar.

Auf Grund dieser Ergebnisse scheint das modifizierte Testsystem empfindlicher zu sein als die früher beschriebenen Variationen desselben Systems (9,118,153,160) und deutlich empfindlicher als andere Erythrozyten/Antikörper Kombinationen (145,150). Die Meerschweinchen-Erythrozyten sind zudem in der Lage, sowohl den klassischen als auch den alternativen Reaktionsweg im Rinderserum zu aktivieren. Diese Tatsache erlaubt es, die beiden Reaktionswege mit dem gleichen System zu messen und demzufolge die Titer auch direkt zu vergleichen.

Die praktisch identischen Werte beider Reaktionswege und eine gute Korrelation ($r=0.98$) zwischen den Titern des klassischen und des alternativen Weges in den einzelnen Seren weisen darauf hin, dass die limitierende Komponente im Komplementsystem im Rinderserum nicht im Aktivierungsteil der beiden Reaktionswege sondern irgendwo zwischen C5 und C9 zu suchen ist. Somit ist es wahrscheinlich, dass die frühen Komponenten auch noch in Verdünnungen aktiviert werden können, in denen das System als ganzes nicht mehr funktionsfähig ist. Dies kann insofern von einiger Bedeutung sein, als für die wichtigsten biologischen Aktivitäten fast ausschliesslich die Komponenten bis C5 verantwortlich sind.

Die Zeitstudie (Abb. 7) zeigt, dass die Blockierung des klassischen Reaktionsweges zu einer deutlich verlangsamten Lyse der Erythrozyten führt. Der Kurvenverlauf lässt zudem vermuten, dass vor allem der Reaktionsbeginn verzögert ist. Hat die komplementbedingte Lyse einmal eingesetzt, so unterscheidet sich die Kinetik der Reaktion nicht von derjenigen des klassischen Reaktionsweges. Nach einer Reaktionszeit von 90 Minuten ändern sich die Titer nur mehr geringfügig. In der

Folge wurden deshalb alle Bestimmungen nach dieser Zeit mit kalter EDTA-Lösung gestoppt und das Ausmass der Hämolyse unmittelbar darauf photometrisch bestimmt.

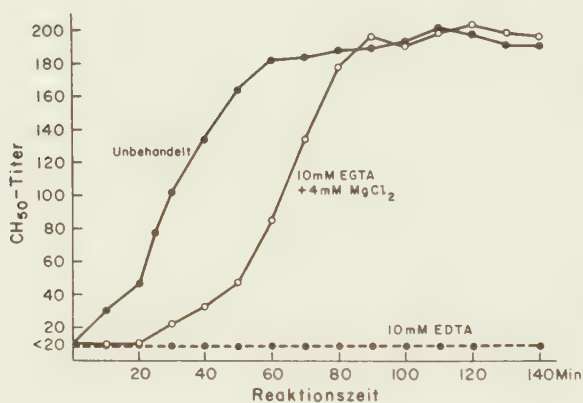


Abb. 7: Gesamte hämolytische Komplementaktivität und Aktivität des alternativen Reaktionsweges in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

b. Komplementaktivität in der Milch

In einer ersten Untersuchung wurden von 31 Kühen, die an mindestens einem Viertel eine chronisch subklinische Mastitis aufwiesen, je zwei Milchproben entnommen. Eine Probe vom erkrankten Viertel und die zweite Probe von einem gesunden Kontrollviertel. Der Einfachheit halber werden diese beiden

Proben im Folgenden als "gesund" oder "erkrankt" bezeichnet. Diese 31 Probenpaare wurden nun bezüglich Komplementaktivität, Komplement-C3-Konzentration und Serum-Albumin-Gehalt miteinander verglichen. Die Serum-Albumin-Konzentration (BSA) diente als Parameter für den passiven Übertritt von Serumbestandteilen in die Milch oder als Mass für die Schädigung der Blut-Euterschranke durch die Mastitis (34).

Tab. 4: Komplement-C3- und Serum-Albumin-Konzentrationen in paarigen Milchseren eines gesunden und eines erkrankten Viertels von 31 Kühen

Viertel	Serum Albumin ($\mu\text{g/ml}$)	Komplement C3 (% des Blutserum- spiegels)
gesund (n=31)	207 ± 49	2.68 ± 0.95
erkrankt (n=31)	450 ± 270	4.92 ± 2.19

Die mittleren Konzentrationen für Komplement C3 und BSA (Tab. 4) in den Milchseren der erkrankten Viertel sind ungefähr doppelt so hoch wie in denjenigen gesunder Viertel. Die Variation zwischen den einzelnen Proben ist allerdings auch deutlich grösser, was aus der relativ grossen Standardabweichung ersichtlich ist.

Die Häufigkeitsverteilung der BSA Konzentrationen (Abb. 8) für die Proben der gesunden und erkrankten Viertel macht dies noch deutlicher. Die Schwankungsbreite in normaler Milch ging von 60 bis 300 $\mu\text{g/ml}$. In den Seren aus den erkrankten Vierteln war diese Variation deutlich grösser, mit mehr als zwei Drittel der Proben mit BSA Konzentrationen über 300 $\mu\text{g/ml}$. In 11 der 31 Fälle lag die Konzentration in den erkrankten Vierteln allerdings im selben Bereich wie die Konzentrationen gesunder Viertel. Wurden jedoch die Probenpaare miteinander verglichen, so war die Konzentration im erkrankten Viertel in allen 31 Probepaaren immer mindestens doppelt so hoch wie im entsprechenden gesunden Viertel.

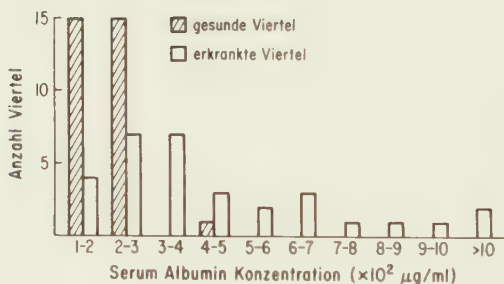


Abb. 8 : Häufigkeitsverteilung der BSA Konzentrationen in paarigen Milchseren eines gesunden und eines erkrankten Viertels von 31 Kühen

Ein ähnliches Bild zeigte auch die Verteilung der Komplement-C3-Konzentrationen in den Probenpaaren. Während die Werte in gesunden Vierteln nie über 4 % des Blutserumspiegels lagen und zudem nur in relativ engen Grenzen schwankten, konnten in den Proben aus den erkrankten Vierteln Werte bis zu 16 % des Blutserumspiegels gefunden werden. In der Hälfte der Proben unterschieden sich die Werte allerdings nicht von denjenigen in normaler Milch. Aber auch hier gilt, dass die Konzentration im erkrankten Viertel immer deutlich höher war als im gesunden Viertel.

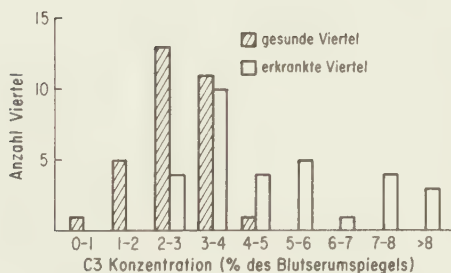


Abb.9 : Häufigkeitsverteilung der Komplement-C3-Konzentrationen in paarigen Milchseren eines gesunden und eines erkrankten Viertels von 31 Kühen

Zwischen der Komplement-C3- und der BSA-Konzentration bestand eine recht enge Korrelation (Abb. 10). Diese Feststellung gilt allerdings nur für die Verhältnisse in den erkrankten Vierteln. Für die normalen Proben liess sich lediglich ein Korrelationskoeffizient von $r=0.4$ errechnen. Aus dem Verlauf der Regressionsgeraden scheint es wahrscheinlich, dass beiden Konzentrationsänderungen der gleiche Mechanismus zu Grunde liegt. Da der Uebertritt von BSA vom Blut in die Milch passiv im Sinne einer reinen Diffusion auf Grund veränderter Permeabilitätsverhältnisse erfolgt, ist anzunehmen, dass dies auch für Komplement C3 zutrifft.

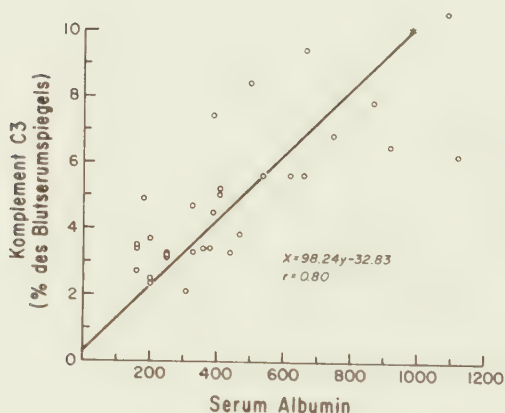


Abb.10: Beziehung zwischen der Serum-Albumin- und der Komplement-C3-Konzentration in 31 Milchseren von erkrankten Vierteln

Hämolysische Aktivität (Tab.5) war weder in der Milch gesunder noch in derjenigen aus subklinisch erkrankten Vierteln nach der üblichen Reaktionszeit von zwei Stunden festzustellen. Wurde die Reaktionszeit allerdings auf 18 Stunden ausgedehnt, so war hämolysische Aktivität in ungefähr einem Drittel der Proben aus den erkrankten Vierteln messbar. Zehn der 12 Proben zeigten allerdings nur Hämolysen in den Verdünnungen bis 1:4, während die beiden übrigen Proben auch noch in der 1:8 Verdünnung zu hämolysieren vermochten.

Tab.5: Hämolysische Komplementaktivität in paarigen Milchseren eines gesunden und eines erkrankten Viertels von 31 Kühen

Viertel	Anzahl Proben mit Aktivität	
	Inkubation: 2 Stunden	Inkubation: 18 Stunden
gesund (n=31)	0	1
erkrankt (n=31)	0	12

Eine identische Vergleichsuntersuchung wurde in der Folge auch an Kühen durchgeführt, die an einer akuten, fieberhaften Mastitis litten. Die Unterschiede zwischen den gesunden Kontrollvierteln und den akut erkrankten waren deutlich grösser

(Abb.11). Bezüglich BSA- und Komplement-C3-Konzentrationen in den erkrankten Vierteln war praktisch kein Ueberlappen mehr zu sehen. Der maximal gefundene Wert für BSA war 19.6 mg/ml und für C3 41% der Blutserumkonzentration. Der Korrelationskoeffizient für die beiden Parameter stieg auf $r=0.91$ an.

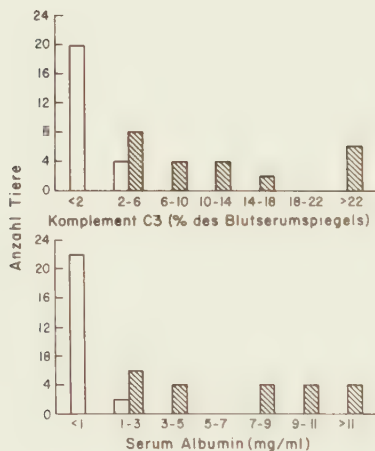


Abb. 11: Häufigkeitsverteilung der Serum-Albumin- und der Komplement-C3-Konzentrationen in paarigen Milchseren von gesunden und erkrankten Vierteln von 24 Kühen

Erwartungsgemäss war in den gesunden Kontrollvierteln keine hämolytische Komplementaktivität feststellbar. In 12 der 24 Proben aus den erkrankten Vierteln dagegen war hämolytische Aktivität messbar. Die CH50-Titer variierten zwischen 1.0 und 41.2. Überraschenderweise bestand jedoch keine Korrelation zwischen den CH50-Titern einerseits und der BSA- oder der C3-Konzentration andererseits.

Alle vier Proben mit CH50-Titern über 20 zeigten im Hämolysetest ein Prozonphenomen. Dies ist in Abb. 12 an einem Beispiel dargestellt. Die Extinktion des Reaktionsgemisches wurde dabei nicht wie üblich gegen diejenige der Negativkontrolle sondern gegen diejenige der Pufferlösung ohne Erythrozyten gemessen. Unverdünntes Milchserum, die 1:2 und die 1:4 Verdünnung zeigten deutlich eine Hemmung der hämolytischen Aktivität. Die ersten beiden Werte lagen sogar tiefer als diejenigen der Negativkontrolle (Puffer+Erythrozyten). In den Verdünnungen 1:8 bis 1:64 hatte dann Hämolyse stattgefunden, während in den höheren Verdünnungen die Werte wieder unter diejenigen der Negativkontrolle abfielen. Erst in Verdünnungen über 1:512 näherten sich die Extinktionen denjenigen der Negativkontrolle. Das Auftreten "subnegativer" Werte war bei vielen Bestimmungen in Milchseren zu beobachten, insbesondere dann, wenn die Ionenstärke des Puffers leicht reduziert wurde. Auf das Prozonphenomen und die "subnegativen" Werte wird bei der Besprechung der antikomplementären Eigenschaften nochmals eingegangen.

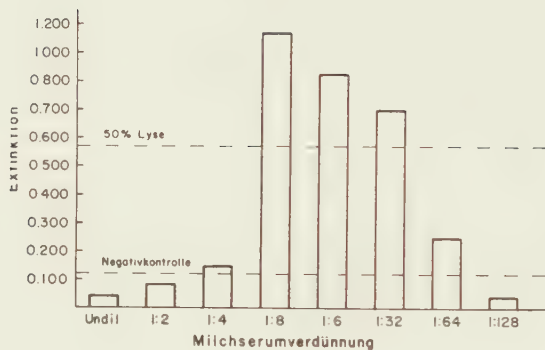


Abb. 12: Prozonenphänomen der CH50 Bestimmungen in Milchserum

c. Komplementaktivität im Kolostrum

Obschon die Bedeutung kolostraler Immunglobuline und deren Aufnahme durch Absorption im Darm neugeborener Kälber in einer fast unübersehbaren Zahl von Untersuchungen zweifelsfrei bewiesen ist, liegen nur wenige Angaben über den direkten in vitro Einfluss von Kolostrum auf Mikroorganismen vor (21,143). Die Untersuchungen zur bakteriziden Aktivität von Kolostrum auf gram-negative Mikroorganismen (21,142,143) und die konglutinierenden Eigenschaften (143) deuten darauf hin, dass Komplement in diesen Prozessen eine gewisse Rolle spielt und dass wahrscheinlich die ganze Komplementkaskade im Kolostrum vorhanden und funktionell ist (48,142,143).

Versuche zur direkten Messung von Komplementaktivität oder einzelner Komplementkomponenten im Kolostrum sind jedoch nur spärlich unternommen worden und die Ergebnisse sind widersprüchlich (21,48,143). Zum Teil dürften diese unterschiedlichen Befunde auf nicht optimale Testsysteme (143), auf Unterschiede in der Probenzubereitung (21,48,143) und auf falsche Lagerung der Proben zwischen der Entnahme und der Aktivitätsmessung (151) zurückzuführen sein.

Meerschweinchen-Erythrozyten, sensibilisiert mit bovinen natürlichen Antikörpern, sind zur Zeit als das empfindlichste bekannte Testsystem für die Bestimmung von hämolytischer Komplementaktivität beim Rind zu bezeichnen. Bislang liegen keine Untersuchungen mit diesem Testsystem im Kolostrum vor. Es schien deshalb angezeigt, die Verhältnisse unter diesem Gesichtswinkel nochmals zu untersuchen, um die Befunde mit denjenigen im Blutserum sowie normalen und veränderten Milchproben direkt vergleichen zu können.

In Tab. 6 sind die Ergebnisse der Bestimmung von hämolytischer Komplementaktivität in 32 Viertelsgemelkproben von 8 Kühen dargestellt. Alle Kühe und Viertel waren in dem Sinne frei von Mastitis, als sich anlässlich der mikrobiologischen Untersuchungen am ersten und am dritten Tag nach dem Abkalben keine euterpathogenen Erreger isolieren liessen. Die Durchführung des CMT als Methode zur indirekten Bestimmung der Zellzahl zeigte in allen Proben ein negatives Resultat.

Unmittelbar nach dem Abkalben war in 14 Vierteln von 4 Kühen hämolytische Komplementaktivität nachweisbar. Der maximale CH50-Titer betrug allerdings nur 4.6 und bereits nach 12 Stunden waren alle Proben mit einer Ausnahme negativ. Diese Titer sind niedriger als die kürzlich von ECKBLAD et al. gefundenen Werte (48). Bei den obigen Proben handelt es sich allerdings um Viertelsgemelksproben von mastitisfreien Kühen, während seine Untersuchungen in Mischmilch der vier Viertel durchgeführt wurden. Zudem ist der Gesundheitszustand der

Tab. 6: Hämolysische Komplementaktivität in 32 kolostralen Milchseren von 8 Kühen

Zeit nach Abkalben (Stunden)	Anzahl Viertel	
	mit Hämolysen	ohne Hämolysen
1	14	18
12	1	31
24	0	32

einzelnen Viertel nicht abgeklärt worden. In zusätzlichen Untersuchungen in Kolostrumproben von 8 Vierteln mit subklinischen Staphylokokkeninfektionen und deutlich positiver CMT-Reaktion am 5. Tag wurden denn auch deutlich höhere CH50-Werte (8.6-46.8) im frühen Kolostrum gefunden.

Die Komplement-C3-Konzentrationen (Abb. 13) zeigten unmittelbar nach der Geburt überraschend hohe Werte um 40 % der normalen Blutserumkonzentrationen. Dies waren die höchsten Werte, die überhaupt je in der Milchdrüse gefunden wurden. Diese Diskrepanz zwischen hohen C3-Konzentrationen und nur geringer hämolysischer Aktivität ist insofern überraschend, als in den meisten Untersuchungen hohe C3-Werte mit deutlicher hämolysischer Aktivität korreliert waren.

Mit einsetzender Laktation fielen die Werte rasch ab und bereits nach 48 Stunden waren sie nicht mehr von denjenigen in normaler Milch unterscheidbar. Einen identischen Verlauf zeigten auch die Serum-Albumin- und die Gesamtprotein-Konzentrationen. Daraus ist zu schliessen, wie dies schon für die normale Milch postuliert wurde, dass für die Konzentrationsän-

derungen wahrscheinlich auch dieselben Mechanismen verantwortlich sind.

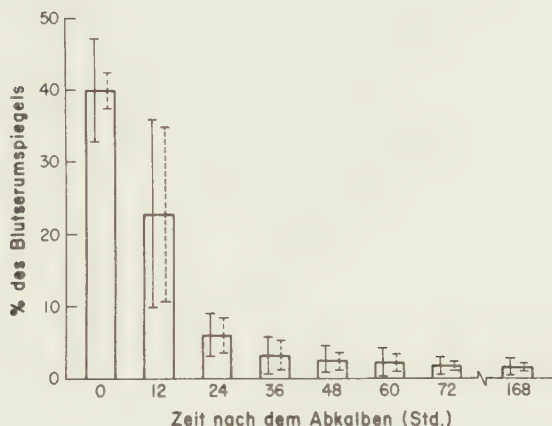


Abb. 13: Komplement-C3-Konzentrationen in 32 kolostralen Milchseren von 8 mastitisfreien Kühen

— = Standardabweichung der 32 Einzelwerte

- - - = Standardabweichung der gemittelten Werte der 8 Kühe

d. Komplementaktivität während der Trockenzeit

Der Beginn der Trockenzeit ist eine der Perioden, in denen das Risiko einer Infektion deutlich erhöht ist im Vergleich zu anderen Zeitabschnitten der Laktation (172). Es schien deshalb angezeigt, die Präsenz und Aktivität von Komplement in der Milchdrüse auch in dieser Periode zu untersuchen. Zu diesem Zwecke wurden drei unträchtige Kühe im 6. Laktationsmonat trockengestellt. Unmittelbar vor dem Trockensstellen, bis zum 10. Tag täglich und anschliessend jeden

zweiten Tag wurden Viertelmilchproben entnommen und nach Präzipitation mit Rennin die Konzentrationen von Serum-Albumin und Komplement-C3 und die hämolytische Aktivität als CH50-Titer bestimmt. Die Bestimmung der Serum-Albumin-Konzentration (Abb. 14) diente wiederum als Mass für den passiven Übertritt von Serumproteinen vom Blut in die Milchdrüse. Sie zeigte ein Ansteigen der Konzentrationen um einen Faktor 10 im Verlaufe der ersten 14 Tage der Trockenzeit, gefolgt von einem Abfall auf etwa zwei Drittel dieses maximalen Wertes nach 16 Tagen.

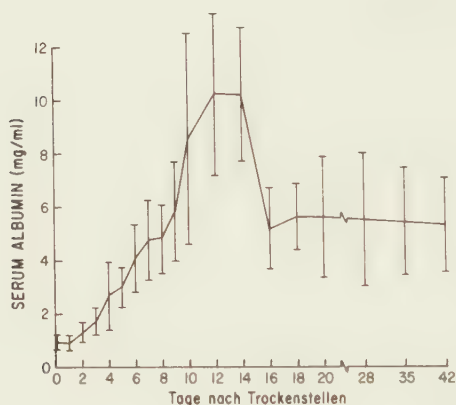


Abb. 14: Serum-Albumin-Konzentrationen in Viertelproben von 3 Kühen nach dem Trockenstellen ($\bar{x} \pm s$)

Über den weiteren Verlauf der Trockenzeit blieb dieser Spiegel dann weitgehend konstant. Die relativ grosse Standardabweichung ist vor allem bedingt durch Unterschiede zwischen den drei Kühen. Die Unterschiede zwischen den vier Vierteln

einer Kuh waren dagegen nur gering. Lag hingegen eine chronische Infektion vor, wie dies in zwei Vierteln der Fall war, so lagen die Werte immer ungefähr 30% unter denjenigen der nicht infizierten Viertel. Die Abnahme der BSA Konzentration in infizierten Vierteln ist gerade eine gegenteilige Reaktion im Vergleich zu den Verhältnissen während der Laktation. Ob eine verzögerte Involution oder eine erhöhte Reabsorption dafür verantwortlich ist, ist unbekannt. Für eine verzögerte Involution spricht, dass das Sekret der infizierten Viertel grobsinnlich seinen Milchcharakter während längerer Zeit beibehielt als das Sekret der nicht infizierten Viertel. Allerdings hatten sich die Konzentrationen auch nach 6-wöchiger Trockenzeit, als makroskopisch keine Unterschiede mehr feststellbar waren, noch nicht normalisiert. Es scheint deshalb am wahrscheinlichsten, dass eine zeitlich gestaffelte Kombination beider Faktoren für die Unterschiede verantwortlich ist.

Die Komplement-C3-Spiegel im Trockensekret (Abb.15) zeigten einen praktisch analogen Verlauf wie diejenigen der Serum-Albumin-Konzentrationen. Unterschiede bestanden nur insofern, als die maximalen Werte etwas früher, bereits am 10. Tag, erreicht wurden. Die Konzentrationen von 25 bis 30% der Blutserumspiegel sind beträchtlich, verglichen mit den Werten, die während der Laktation gefunden werden können. Die Unterschiede, ersichtlich aus der relativ grossen Standardabweichung, waren wiederum vorwiegend auf Unterschiede zwischen den Tieren und nur zum kleinen Teil auf Unterschiede zwischen den einzelnen Vierteln einer Kuh zurückzuführen. Im Falle des Vorliegens einer subklinischen Mastitis waren die Werte, wie schon bei den BSA Konzentrationen erwähnt, immer um etwa 30% erniedrigt. Dies ist wiederum ein Hinweis auf gleiche Ursache und identische Mechanismen.

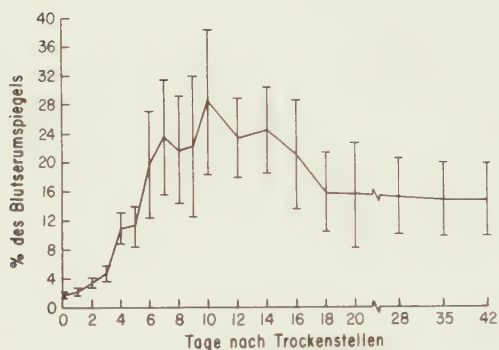


Abb. 15: Komplement-C3-Konzentrationen in Viertelproben von drei Kühen nach dem Trockenstellen ($\bar{x} \pm s$)

Die hämolytische Aktivität im Trockensekret (Abb. 16) zeigte einen etwas anderen Verlauf. Zu Beginn der Trockenzeit zeigte nur gerade ein Tier im Mischsekret der vier Viertel hämolytische Aktivität. Dazu ist anzumerken, dass dieses Tier in zwei Vierteln eine chronische Infektion mit *Staph. aureus* aufwies, die über die ganze Untersuchungsperiode bestehen blieb.

Die CH50-Werte erreichten bereits nach zwei bis drei Tagen einen ersten Peak mit Werten bis zu 54. Diese Werte sind etwa vergleichbar mit denjenigen, die bei schweren akuten Mastitiden gefunden werden konnten. Dies war insofern überraschend, als zu dieser Zeit noch kaum Veränderungen bezüglich Serum-Albumin- und Komplement-C3-Konzentrationen zu sehen waren. In den folgenden Tagen fielen die Titer um rund die Hälfte ab, stiegen jedoch zwischen Tag 8 und 10 der Trocken-

zeit wieder deutlich an. Bei einem Tier waren sogar Werte erreicht worden, wie sie sonst nur im Blutserum zu finden sind. Mit Fortschreiten der Trockenzeit gehen die CH50-Titer wieder allmählich zurück und erreichen Werte zwischen 8 und 16, ungefähr 6 Wochen nach dem Trockenstellen.

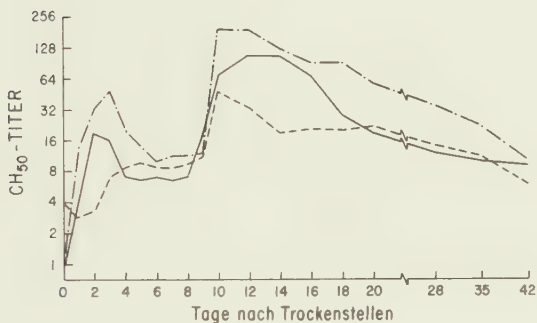


Abb. 16: Hämolysische Komplementaktivität im Mischsekret der vier Viertel von drei Kühen nach dem Trockenstellen

Wie bereits für die Serum-Albumin- und die Komplement-C3-Konzentration erwähnt, waren auch die CH50-Titer im Sekret der infizierten Viertel immer deutlich niedriger als in den nicht infizierten Vergleichsvierteln.

Nach Blockierung des klassischen Reaktionsweges mit Mg-EGTA war in den Proben der ersten 6 Tage der Trockenzeit keine hämolysische Aktivität mehr vorhanden. Ab Tag 7 nach dem Trockenstellen war Aktivität des alternativen Reaktionsweges

messbar. Sie war in allen Fällen ungefähr halb so hoch wie die Titer der gesamten Komplementaktivität. Es ist durchaus möglich, dass diesem Fehlen alternativer Komplementaktivität in der frühen Trockenzeit eine besondere Bedeutung bezüglich des erhöhten Infektionsrisikos während dieser Zeit zukommt.

e. Aktivität des alternativen Reaktionsweges in der Milch

Da für die Aktivierung des alternativen Reaktionsweges und für seine Funktion keine Antikörper notwendig sind, kommt diesem Reaktionsweg in der Milchdrüse eine ganz besondere Bedeutung zu, sind doch die Antikörperkonzentrationen, verglichen mit denjenigen im Blutserum, immer sehr gering (122). Eine Ausnahme dazu bilden nur die Trockenzeit und die frühe Kolostralphase. Die Aktivierung des Komplementsystems auf dem alternativen Reaktionsweg könnte diese Insuffizienz wenigstens teilweise ausgleichen.

Aus diesem Grunde wurde in 58 Milchseren, in denen hämolytische Aktivität messbar war, der klassische Reaktionsweg mit Mg-EGTA blockiert und anschliessend die verbleibende Aktivität gemessen. Die Ergebnisse (Tab.7) zeigen, dass in Proben mit gesamter CH50-Aktivität von weniger als 4 nie eine Aktivität des alternativen Reaktionsweges gefunden werden konnte. Alle Proben mit gesamter Aktivität über 16 zeigten dagegen auch Hämolyse nach Blockierung des klassischen Reaktionsweges.

Die Titer der Proben mit Aktivität des alternativen Reaktionsweges betrugen meistens 30 bis 50% der gesamten Aktivität. In allen positiven Proben wurde zudem ein Prozonophänomen festgestellt bis zu Verdünnungen von 1:4 oder 1:8. Dies bedeutet, dass die Aktivität des alternativen Weges in unverdünnten Milchseren und in den 1:2 und 1:4 Verdünnungen

Tab. 7: Aktivität des alternativen Reaktionsweges in 58 Milchseren mit hämolytischer Aktivität

CH50-Titer	
gesamte Aktivität	Aktivität des alternativen Reaktionsweges
bis 4 (n=26)	alle negativ
4.1 - 15.9.(n=20)	12 negativ, 8 positiv
>16 (n=12)	alle positiv

vollständig gehemmt ist. Dieser Befund könnte auch für das Mastitisgeschehen von einiger Bedeutung sein. Durch die Unmöglichkeit, Komplement auf dem alternativen Weg zu aktivieren, ist die Milchdrüse auch nur bedingt in der Lage, eindringende Organismen wirksam zu bekämpfen. Dieser Mechanismus verhindert andererseits natürlich auch die unkontrollierte Aktivierung des Systems via den alternativen Reaktionsweg, wie dies durch Fettkügelchen oder Proteinaggregate durchaus möglich wäre (90).

f. Komplementaktivierung durch serumempfindliche und serumresistente Stämme von *E. coli*

Die Bedeutung des Komplementsystems im Mastitisgeschehen basiert auf seiner Beteiligung an zwei grundsätzlich unterschiedlichen Reaktionsabläufen. Zum einen führt die Bildung von Anaphylatoxinen, Chemotaxinen und Entzündungsmediatoren zur Bereitstellung, Heranschaffung und Aktivierung der für die Abwehr wichtigen humoralen und zellulären Mechanismen. Unab-

hängig von diesen entzündlichen Vorgängen kommt es andererseits auch zu einer direkten Interaktion zwischen einzelnen Komponenten und den eindringenden Erregern. Diese direkte Auseinandersetzung führt zur Fixation einzelner aktivierter Komponenten an die Oberfläche der Erreger. Für die Abwehr sind dabei in erster Linie die Opsonierung durch Bindung von C3b und die direkte Lyse durch Fixation von C6 bis C9 von Bedeutung.

Zwei *E. coli* Stämme mit unterschiedlicher Euterpathogenität und unterschiedlicher Serumempfindlichkeit (10,27,28) wurden deshalb auf ihre Fähigkeit zur Aktivierung des Komplementsystems untersucht.

Zu 100 μ l einer Verdünnungsreihe von frischem Rinderserum wurden unterschiedliche Mengen einer standardisierten Erregersuspension zugegeben und während einer halben Stunde bei 37 C inkubiert. Sind die Erreger in der Lage, das Komplementsystem zu aktivieren, so werden sie während dieser Inkubation einen Teil des im frischen Serum zur Verfügung stehenden Komplements verbraucht haben. Die verbleibende Aktivität, gemessen als gesamte CH50-Aktivität, ist dadurch geringer als in unbehandeltem Serum. Der Titerabfall in diesem kompetitiven Testsystem ist direkt korreliert mit der Fähigkeit der Erreger, Komplement auf einem der beiden Reaktionswege zu aktivieren.

Die Ergebnisse dieses Experimentes in 6 verschiedenen Rinderseren sind in Abb. 17 dargestellt. Es ist daraus ersichtlich, dass beide Stämme in der Lage waren, Komplement zu aktivieren. Das Ausmass der Aktivierung war erwartungsgemäss abhängig von der Erregerzahl und vom individuellen Stamm. Unerwartet dagegen war die Tatsache, dass der serumresistente Stamm (12795) deutlich mehr Komplement konsumiert hatte als der serumempfindliche (Lilly). Dieser Befund wurde in der Folge an zwei weiteren *E. coli* Stämmen bestätigt. Es war eigentlich erwartet worden, dass die Serumempfindlichkeit mit

der Fähigkeit, Komplement zu aktivieren, in Beziehung steht, was offenbar nicht direkt der Fall ist. Allerdings ist in Betracht zu ziehen, dass Komplementaktivierung und damit Verbrauch einzelner Komponenten nicht zwangsläufig auch heissen muss, dass die einzelnen aktivierten Komponenten von den Erregern gebunden werden und dass komplementbedingte Lyse der Erreger stattfindet. Auf diese Frage wird im Kapitel über die direkte Bestimmung von fixiertem C3 nochmals eingegangen.

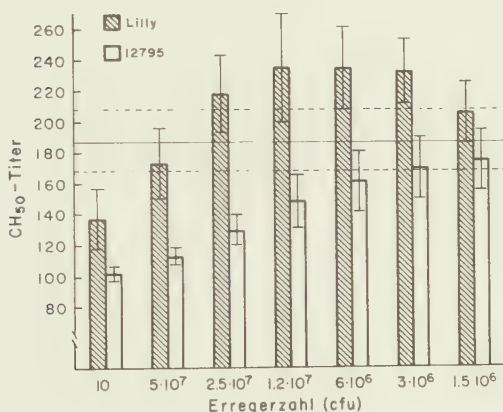


Abb. 17: Aktivierung und Verbrauch von Komplement in 6 frischen Seren durch zwei *E. coli* Stämme mit unterschiedlicher Serumempfindlichkeit ($\bar{x} \pm s$)

Der Anstieg der CH₅₀-Titer in den frischen Seren nach Inkubation mit niedrigen Erregerzahlen des serumempfindlichen Stammes zeigt zudem die Komplexität des Prozesses auf. Offensichtlich werden nicht nur Komplementkomponenten verbraucht

oder gebunden, sondern die Regulatoren des Systems sind in diesen Vorgang miteinbezogen und sie werden vom serumempfindlichen Stamm bevorzugt fixiert.

g. Komplementaktivität bei Endotoxin induzierten Mastitiden

Die in den vorangehenden beiden Kapiteln besprochenen Befunde geben mehr oder weniger statische Zustände wieder, wie sie eine gewisse Zeit vor oder nach einer Mastitis gefunden werden können. Sie geben hingegen keine Auskunft über die Veränderungen in der kritischen Zeit zu Beginn einer Erregerinvasion. Die Mobilisierung und Aktivierung von Komplement zu Beginn der Auseinandersetzung mit eindringenden Mikroorganismen ist jedoch eines der entscheidenden Ereignisse im Abwehrprozess.

Für die Untersuchung der Veränderungen in den Anfangsstadien einer Mastitis wurde in total 28 Vierteln von 12 Kühen experimentell eine Mastitis induziert. Dazu wurden unterschiedliche Dosen von *E. coli* Lipopolysaccharid B in die betreffenden Euterviertel instilliert (53,67,86). *E. coli* Lipopolysaccharid B wird in der Folge kurz als Endotoxin oder LPS bezeichnet.

In einer ersten Untersuchung wurden je 50 µg LPS in 8 gesunde Viertel von 4 Kühen instilliert und anschliessend die CH50-Titer und die Komplement-C3-Konzentrationen im Blutserum der vier Kühe in regelmässigen Intervallen gemessen. In den Milchseren der behandelten Viertel wurden als Parameter für den Grad der vorliegenden Entzündung zusätzlich die Zellzahl und die Serum-Albumin-Konzentration bestimmt (59,84,85).

Die CH50-Titer im Blutserum der vier Kühe zu verschiede-

nen Zeitpunkten nach der LPS-Instillation sind in Abb. 18 dargestellt. Innerhalb der ersten vier Stunden nach der Behandlung mit Endotoxin fiel der Titer bei allen Kühen von 185 auf rund 135 ab. Dieser Abfall um rund 50 Einheiten bedeutet, dass fast 30% der normalerweise vorhandenen Aktivität verloren ging und dass der Zustand zu diesem Zeitpunkt zweifellos als hypokomplementämisch zu bezeichnen ist. Über die nächsten 8-12 Stunden blieb die Aktivität auf dieses Niveau reduziert. Nach 24 Stunden jedoch waren die Werte bei allen 4 Tieren wieder auf vorexperimenteller Höhe und nach 3 und 4 Tagen war sogar ein kompensatorischer Anstieg auf erhöhte Werte zu sehen.

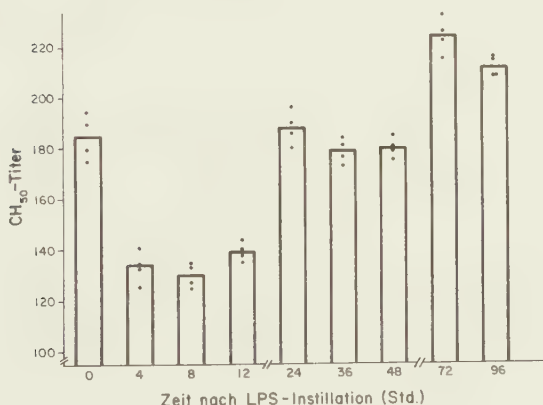


Abb. 18: Hämolysische Komplementaktivität im Blutserum von 4 Kühen nach Instillation von 50 μ g E. coli Lipopolysaccharid B in je zwei Viertel

Für den Abfall zu Beginn der Mastitis sind grundsätzlich zwei

Erklärungen in Betracht zu ziehen. Erstens ist es durchaus möglich, dass ein Übertritt von Komplement oder wenigstens einzelner Komponenten vom Blut in die Milch stattfindet und so zu einem Abfallen der Aktivität im Blutserum Anlass gibt. Als zweite Möglichkeit ist in Betracht zu ziehen, dass LPS im Euter absorbiert wird und in die Blutbahn gelangt (197). Wie bereits in der Besprechung der Literatur erwähnt, ist Endotoxin in der Lage, direkt das Komplementsystem zu aktivieren (109). Dies kann durch den Lipid A Teil auf dem klassischen oder durch den Polysaccharid Teil auf dem alternativen Reaktionsweg erfolgen und so zu einem Verbrauch von Komplement führen, was sich dann in einem Abfall der messbaren Aktivität manifestiert. Die Wahrscheinlichkeit dieser These wurde in einem zusätzlichen Experiment etwas genauer verfolgt. Zu fri-

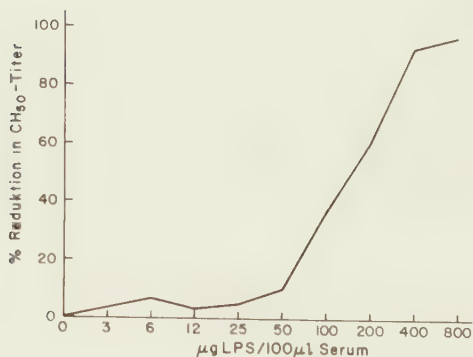


Abb. 19: Reduktion des CH₅₀-Titters im Serum von sechs Kühen nach Inkubation mit unterschiedlichen Mengen von Endotoxin

schen Seren von sechs verschiedenen Kühen wurden unterschiedliche Mengen von Lipopolysaccharid gegeben und der Verbrauch von Komplement als prozentualer Titerabfall nach 30 minütiger Inkubation bestimmt.

Die in Abb. 19 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass mindestens 1000 μ g LPS pro ml Serum notwendig sind, um in dieser Zeit einen Abfall des Titers um 30% zu bewirken. Unter Berücksichtigung der im Mastitisexperiment verwendeten Dosis und der in der Literatur beschriebenen Endotoxinspiegel im Blut (198) ist es deshalb unwahrscheinlich, dass die Absorption von LPS für den Titerabfall im Blutserum verantwortlich war. Ähnliche Untersuchungen bei Mäusen (24,44) und mit Meerschweinchenserum (110) und humanem Serum (109,110) haben ebenfalls gezeigt, dass relativ hohe Endotoxindosen notwendig sind, um in vitro einen Verbrauch von Komplement zu demonstrieren.

Eine dritte Möglichkeit, diesen Verlauf zu erklären, besteht in der selektiven Absorption von Inhibitoren oder Inaktivatoren des Komplementsystems aus der Milch. Wenn diese Möglichkeit auch auf den ersten Blick nicht sehr wahrscheinlich erscheinen mag, so wird diese These doch durch die Tatsache gestützt, dass bezüglich der Konzentrationen der dritten Komplementkomponente im Serum kein Abfall feststellbar war. Im Falle der beiden vorher erwähnten Möglichkeiten wäre jedenfalls ein solcher Abfall in der C3-Konzentration zu erwarten gewesen.

Veränderungen in der Milch

Als Parameter für den Grad der durch die Endotoxin Instillation verursachten Entzündung wurde auch in diesem Experiment die Zellzahl und die Serum-Albumin-Konzentration in der Milch zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Die Zellzahl (Abb.20) stieg bereits im Verlaufe der ersten vier Stunden um

ungefähr das zehnfache an und nochmals um etwa den gleichen Faktor in den folgenden acht Stunden. Diesem Maximum nach 12 Stunden folgte ein langsamer kontinuierlicher Rückgang auf vorexperimentelle Werte im Verlaufe von 4 bis 5 Tagen.

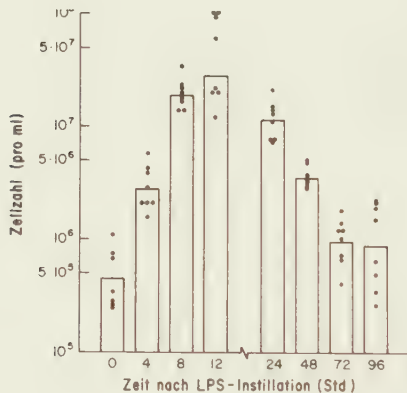


Abb. 20: Zellzahl in der Milch nach Instillation von je 50 μg E. coli LPS in 8 Viertel von 4 Kühen

Ähnlich ist auch der Verlauf für die Serum-Albumin-Konzentration (Abb. 21). Vom Ausgangswert um 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ stiegen die Werte auf das ungefähr Zehnfache an. Obschon diese Werte deutlich erhöht sind, liegen sie doch im unteren Bereich der Spannweite, die bei natürlich auftretenden akuten Mastitiden beobachtet wurde. Im Unterschied zum Verlauf der Zellzahl wurde der Maximalwert bereits zwischen vier und acht Stunden erreicht und der anschließende Abfall auf vorexperimentelle Spiegel erfolgte ebenfalls etwas rascher.

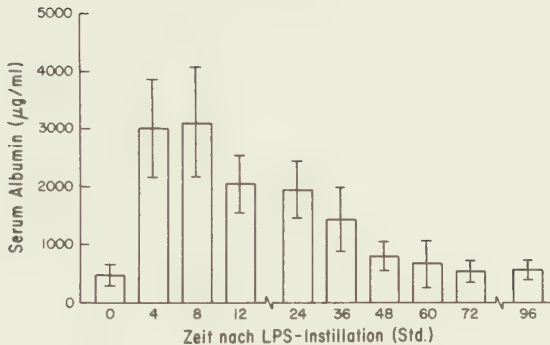


Abb. 21: Serum-Albumin-Konzentration im Milchserum nach Instillation von je 50 µg E. coli LPS in 8 Viertel von 4 Kühen ($\bar{x} \pm s$)

Inwieweit dieser zeitliche Unterschied jedoch auf wahren Unterschieden innerhalb des Euters beruht, ist unklar. Die Leukozyten haften zu Beginn einer Mastitis an den Epithelien und die Zahlen in der Milch täuschen dadurch zu niedrige Werte vor (20,27,85,86). Die Serum-Albumin-Konzentration dürfte deshalb den zeitlichen Verlauf der entzündlichen Reaktion exakter wiedergeben.

Für diese Annahme spricht auch der Verlauf der Komplement-C3-Konzentration in der Milch (Abb. 22). Von einem Ausgangswert von ungefähr 3% des Serumspiegels erfolgte ein Anstieg auf 6 bis 8% innerhalb von 4 bis 8 Stunden. Die relativ grosse Variation in den Werten ist vor allem auf Unterschiede zwischen den Tieren und weniger auf Unterschiede zwischen den

beiden behandelten Vierteln eines Tieres zurückzuführen. Die Unterschiede zwischen den Tieren korrelierten zudem mit der täglich produzierten Milchmenge in dem Sinne, dass die Kühe mit niedrigerer Leistung sowohl höhere Albumin- als auch Komplement-C3-Werte zeigten und rascher die maximalen Konzentrationen erreichten.

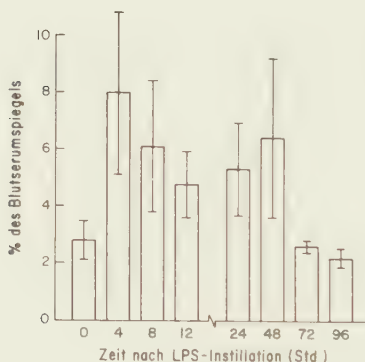


Abb.22 : Komplement-C3-Konzentration im Milchserum nach Instillation von je 50 μ g E. coli LPS in 8 Viertel von 4 Kühen ($\bar{x} \pm s$)

Hämolytische Aktivität für sensibilisierte Meerschweinchen-Erythrozyten (Abb. 23) war erwartungsgemäss in den Proben vor der Endotoxin Instillation nicht messbar. Während der akuten Phase der Mastitis dagegen waren mittlere Titer von 4 bis 8 und ein maximaler Wert von 64 feststellbar. Verglichen mit normalen Blutserumtitern von rund 180 sind diese Werte aller-

Beziehung zwischen der LPS Dosis und der Komplement-aktivität

Auf Grund der im gerade besprochenen Experiment erhaltenen Resultate wurde in einem nächsten Versuch abzuklären versucht, ob und wie weit eine Beziehung besteht zwischen der Endotoxinmenge und der Reaktion bezüglich derselben Parameter. Dazu wurden bei je drei Kühen die vier Viertel mit unterschiedlichen LPS Dosierungen behandelt. Da die Veränderungen nach niedrigen LPS Dosierungen besseren Aufschluss über den Reaktionsablauf zu geben versprochen, wurden LPS Mengen von 5, 10, 25 und 100 μg für die Mastitis-Induktion verwendet. Die Ergebnisse sind am Beispiel eines Tieres in den Abbildungen 24 bis 27 dargestellt.

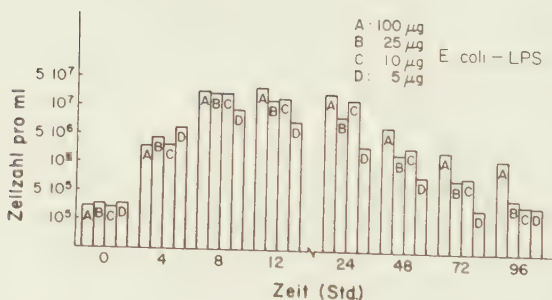


Abb. 24: Zellzahl in der Milch von vier Vierteln einer Kuh nach Behandlung mit unterschiedlichen LPS Dosen

Alle vier LPS Dosierungen führten zu einem deutlichen Anstieg der Zellzahl (Abb. 24) in der Milch im Verlaufe der ersten 12 Stunden der experimentellen Mastitis. Eine deutliche Dosisabhängigkeit zwischen der Endotoxinmenge und der Zellzahl war jedoch nur für die beiden Viertel mit der höchsten und niedrigsten Dosierung zu sehen. Die Veränderungen der Werte im Verlaufe des Versuches war praktisch identisch wie im vorangegangenen Experiment.

Ähnliches wie für die Zellzahlen gilt auch für den Verlauf der Serum-Albumin-Konzentrationen (Abb. 25) in der Milch. Die Dosierungen 10, 25 und 100 μg haben zu praktisch identischen Konzentrationserhöhungen geführt. Nur gerade in der Milch des mit 5 μg behandelten Viertels war eine deutlich niedrigere Konzentration feststellbar.

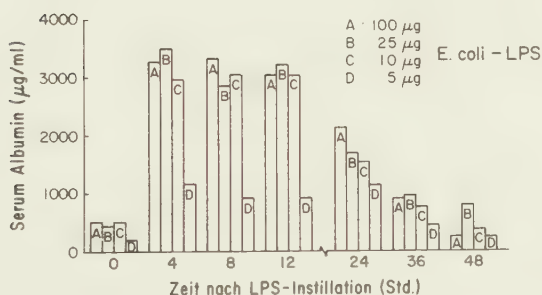


Abb. 25: Serum-Albumin-Konzentration im Milchserum einer Kuh nach Behandlung mit unterschiedlichen LPS Dosen

Die Komplement-C3-Konzentrationen (Abb. 26) zeigen, dass 5 μg LPS zu keinen messbaren Veränderungen dieser Spiegel in der Milch geführt hatten. Da sowohl Serum-Albumin als auch Komplement-C3 wahrscheinlich auf demselben, passiven Weg in die Milch gelangen, war dieser Befund unerwartet.

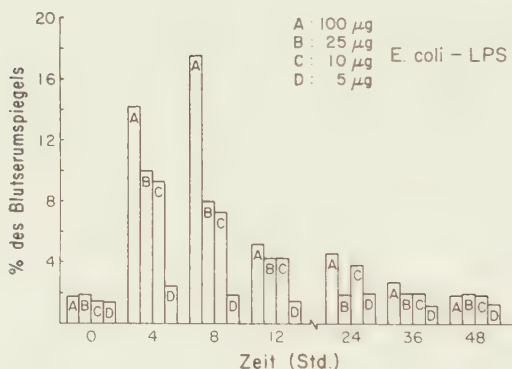


Abb. 26: Komplement-C3-Konzentrationen im Milchserum nach Instillation von *E. coli* LPS in vier Viertel einer Kuh

Die Bestimmung der CH50-Titer in den Milchseren zeigte wiederum, dass vor sowie 24 und mehr Stunden nach der Endotoxin-Instillation keine Aktivität messbar war. Wie schon für die C3-Konzentrationen erwähnt, führten 5 μg LPS in keinem Fall zu messbarer hämolytischer Aktivität. Der Anstieg bezüglich Zellzahl lässt jedoch vermuten, dass Komplementaktivierung in diesen Vierteln stattgefunden hat und dass ausreichende Mengen chemotaktischer Faktoren und vasoaktiver Substanzen gebildet wurden, um zu einem Ansteigen der Zellzahl und zu

einer Erhöhung der Serum-Albumin-Konzentration zu führen. Ob diese unterschiedlichen Reaktionen der vier gemessenen Parameter auf das Vorliegen eines echten Schwellenphänomens zurückzuführen sind, ist zur Zeit noch unklar. Trifft dies zu, so ist jedenfalls sicher, dass unterschiedliche Schwellenwerte erreicht werden müssen für die Mobilisierung von hämolytischer Komplementaktivität einerseits und vasoaktiver und chemotaktischer Faktoren andererseits.

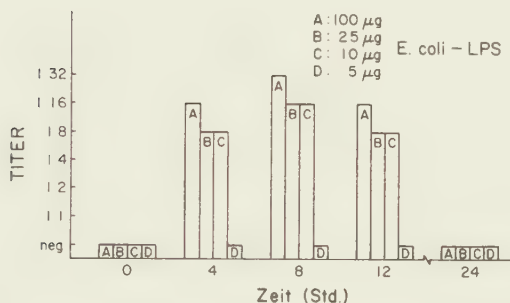
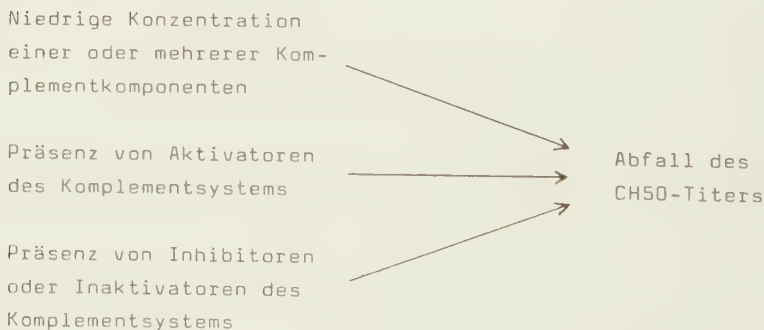


Abb. 27: Hämolytische Komplementaktivität im Milchserum nach Instillation von *E. coli* LPS in vier Viertel einer Kuh

h. Antikomplementäre Aktivität in Milch, Trockensekret und Kolöstrum

Einige der bisher beschriebenen Befunde bezüglich Komplement-Konzentrationen und -Aktivierung in der Milch schienen uns nicht befriedigend und ausreichend erklärt mit der Feststellung, dass es sich einfach um eine Frage niedriger Konzentrationen handelt. Die völlige Abwesenheit hämolytischer Aktivität in normaler Milch und teilweise auch in der Milch akut erkrankter Viertel, die Prozonophänomene und die Extinktionswerte, die niedriger als diejenigen der Negativkontrolle waren, wiesen alle darauf hin, dass die Aktivität des Komplementsystems in der Milchdrüse nicht nur von der Präsenz der einzelnen Komponenten abhängig ist, sondern dass auch ein Regulationssystem aktiv sein musste, das in der Lage war, die Aktivierung des Komplementsystems wenigstens teilweise zu verhindern. Grundsätzlich bestehen drei Möglichkeiten, wie Komplementaktivität, gemessen als CH50-Titer, in negativem Sinne beeinflusst werden kann (Tab. 8).

Tab. 8: Mögliche Ursachen für erniedrigte Komplementaktivität



Niedrige Konzentrationen einer einzelnen oder mehrerer Komponenten werden sich selbstverständlich auch in niedriger Aktivität des gesamten Systems auswirken. Dies gilt besonders für die Komponenten, die nicht Enzyme sind. Sobald eine dieser Komponenten vollständig aufgebraucht ist, ist der Reaktionsablauf unterbrochen, was sich in der Folge als Ausbleiben hämolytischer Aktivität manifestiert. Von biologischer Bedeutung ist selbstverständlich in diesem Fall die Frage, wo in der Komplementkaskade das schwache Glied liegt. Davon hängt dann ab, wie schwerwiegend die Konsequenzen für die biologischen Aktivitäten des Systems sind.

Als Aktivatoren des Komplementsystems können prinzipiell alle Substanzen und Partikel fungieren, die in der Lage sind, das System auf einem der beiden Reaktionswege in Gang zu setzen. Aggregierte Immunglobuline, Antigen-Antikörper-Komplexe, Fettkügelchen und Kasein sind nur einige der in Betracht zu ziehenden Möglichkeiten. Ihre Präsenz und Aktivität führt zwar zum gleichen Ergebnis eines Abfalls der hämolytischen Aktivität, allerdings auf einem völlig unterschiedlichen Weg. Durch die Aktivierung des Systems als Ganzes kommt es zu einem Verbrauch aller Komponenten und zur permanenten Bildung der biologisch aktiven Produkte des Komplementsystems. Die verheerenden Folgen einer solchen permanenten Komplementaktivierung sind von den Immunkomplexkrankheiten des Menschen nur zu gut bekannt.

Die Regulatoren des Komplementsystems (Tab. 1) sind denn auch dafür verantwortlich, eine ungehemmte Aktivierung des Komplementsystems zu verhindern. Während Inhibitoren die Reaktionskette durch kompetitive Bindung an einzelne aktivierte Komponenten unterbrechen, zerstören Inaktivatoren in der Regel einzelne Komponenten aktiv oder begünstigen deren Zerstörung durch Serumproteasen. Die Tatsache, dass eine geordnete Komplementaktivität mit ihren positiven biologischen Effekten nur spielt, wenn das Komplementsystem und seine Regulatoren richtig zusammenspielen, zeigt einmal mehr die Komplexität des

Systems und die vielen Möglichkeiten für Fehlfunktionen.

Zwei der im ersten Abschnitt dieses Kapitels bereits erwähnten Beobachtungen (Prozonenphänomen und "subnegative" Extinktionswerte) lassen sich nach kritischer Betrachtung eigentlich nur mit der Anwesenheit erhöhter Konzentrationen von Inhibitoren oder Inaktivatoren befriedigend erklären. Diese Frage wurde deshalb im Folgenden von einem funktionellen Gesichtspunkt aus etwas näher untersucht.

Für die Quantifizierung der antikomplementären Aktivität war zuerst ein geeignetes Testsystem auszuarbeiten. Dieses ist schematisch in Abb. 28 dargestellt.

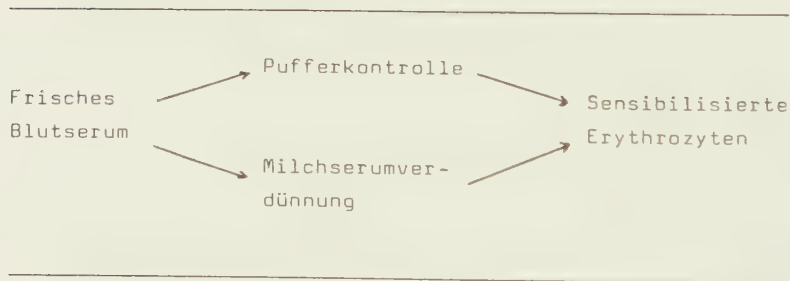


Abb. 28: Testprinzip für den Nachweis antikomplementärer Aktivität im Milchserum

Der Test wurde als Schachbrettitration in Mikrotiterplatten durchgeführt (Abb. 29). Im ersten Schritt wurden vom Frischserum Verdünnungsreihen von links nach rechts hergestellt. Die zweitletzte Kolonne diente dabei als serumfreie Kontrolle, während die letzte Kolonne den Standard mit 50%-iger Hämolyse enthielt. Anschliessend erfolgte die Zugabe der

Milchserumverdünnungen von oben nach unten. In die Löcher der Reihe 8 wurde anstelle von Milchserum Pufferlösung zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation der Serungemische erfolgte die Zugabe der sensibilisierten Erythrozyten, gefolgt von einer weiteren Inkubation von zwei Stunden und anschliessender photometrischer Bestimmung des Ausmasses der Hämolyse. Sind im Milchserum antikomplementäre Faktoren vorhanden, so manifestiert sich dies in einer Abnahme des CH50-Titers im frischen Serum. Das Testverfahren gibt damit Auskunft über das Ausmass vorhandener antikomplementärer Aktivität, sagt jedoch nichts aus über deren Art und Wirkungsweise.

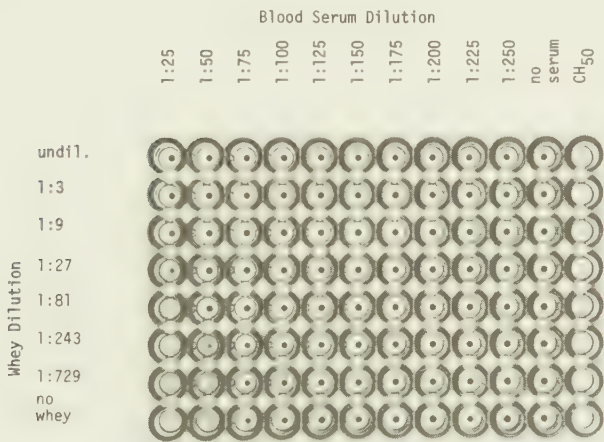


Abb. 29: Schachbrettitration zur Bestimmung antikomplementärer Aktivität in Milchseren

In Abb. 30 ist der Einfluss von frischem und von hitze-inaktiviertem normalem Milchserum auf den CH50-Titer von fri-

schem Blutserum dargestellt. Es geht daraus hervor, dass Milchserum deutliche antikomplementäre Eigenschaften besitzt. Unverdünntes Milchserum reduzierte den CH₅₀-Titer von 180 auf rund 30 bis 40. Erst in Verdünnungen über 1:1000 ging die antikomplementäre Aktivität verloren. Der identische Verlauf für frisches und hitzeinaktiviertes Milchserum zeigt, dass der verantwortliche Faktor durch Erhitzen auf 56 C während 30 Minuten nicht verändert wurde. Die geringe Variation zwischen den 16 Milchseren der vier Rinder zeigt zudem, dass weder grosse Unterschiede zwischen den vier Vierteln eines Tieres noch zwischen den Tieren bestanden. Erwähnenswert scheint zudem, dass alle Proben extrem niedrige Zellzahlen von unter 50 000 pro ml aufgewiesen hatten.

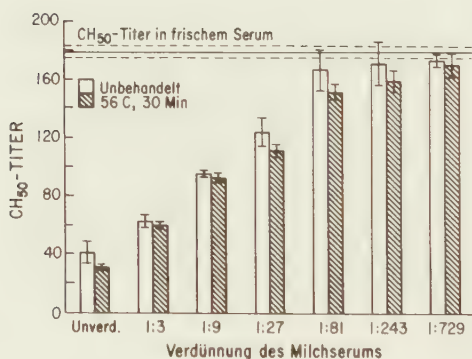


Abb. 30: Einfluss von frischem und von hitzeinaktiviertem Milchserum auf die hämolytische Aktivität von Blutserum ($\bar{x} \pm s$)

Ein etwas differenzierteres Bild zeigte sich bei Tieren, die an einer akuten Mastitis litten. In Abb. 31 sind an einem Beispiel die Verhältnisse dargestellt, wie sie sich acht Stunden nach Endotoxin induzierter Mastitis präsentierten. Das Milchserum aus dem akut entzündeten Viertel wies selber hämolytische Aktivität auf bis zu einer Verdünnung von 1:56.8. Erwartungsgemäss stieg der Titer im Blutserum nach Zugabe dieses Milchserums an. Die Zugabe des Milchserums eines Kontrollviertels ohne eigene hämolytische Aktivität führte ebenfalls zu einem, allerdings nur leichten Ansteigen des CH₅₀-Titers. Es scheint, dass dieses Milchserum eine oder einige der limitierenden Komponenten für die hämolytische Aktivität im Blutserum supplementieren konnte und so den CH₅₀-Titer erhöhte.

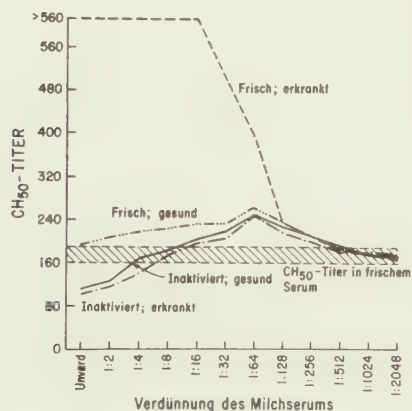


Abb. 31: Änderung des CH₅₀-Titers in Blutserum nach Zugabe von frischem oder hitzeinaktiviertem Milchserum eines gesunden und eines akut entzündeten Viertels

Der Anstieg des CH₅₀-Titers mit steigender Verdünnung des zugegebenen Milchserums lässt es als wahrscheinlich erscheinen, dass mehrere unterschiedliche Mechanismen gleichzeitig im Spiel sind. Am wahrscheinlichsten ist, dass eine Verdünnung und damit eine Abnahme von Inhibitoren oder Inaktivatoren durch die Substitution von Komplementkomponenten überlagert wird. Der Verlauf der Kurven nach Hitzeinaktivierung weist in dieselbe Richtung. Ein Teil der substituierten Komponenten, nicht aber die letztlich limitierende, ist hitzeempfindlich und wird durch die Komplementinaktivierung bei 56 C zerstört. Dadurch bekamen in den niedrigen Milchserumverdünnungen die Inhibitoren oder Inaktivatoren grösseres Gewicht. Nach 1:8 oder 1:16 Verdünnung gewann dann bereits die Substitution von Komponenten die Oberhand.

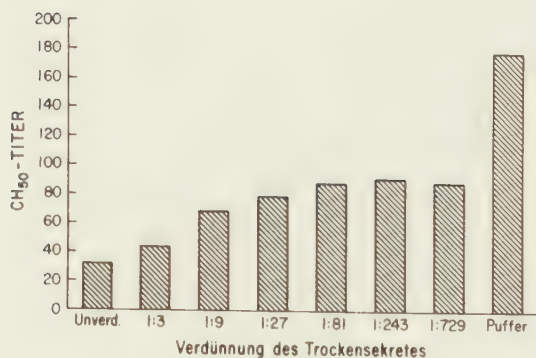


Abb. 32: Antikomplementäre Aktivität in hitzeinaktiviertem Trockensekret von 5 Kühen, 5 bis 7 Wochen nach dem Trockenstellen

In Abb. 32 ist der Einfluss von hitzeinaktiviertem Trockensekret von 5 Kühen, 5 bis 7 Wochen nach dem Trockenstellen, auf die Komplementaktivität in frischem Serum dargestellt.

Der hemmende Einfluss des Trockensekretes auf die Komplementaktivität im Serum war noch deutlicher ausgeprägt als derjenige von normalem Milchserum. Selbst Verdünnungen des Trockensekrets von 1:729 reduzierten den CH50-Titer noch um mehr als 50%. Zu Beginn der Trockenzeit stieg die antikomplementäre Aktivität langsam über einen Zeitraum von ungefähr drei Wochen an und blieb dann über die ganze Trockenzeit auf diesem Niveau. Kurz vor der Geburt, mit Einsetzen der Laktation, fiel die Aktivität deutlich ab und nach dem Abkalben war antikomplementäre Aktivität nur noch bis zu Verdünnungen des Milchserums von 1:243 messbar (Abb.33).

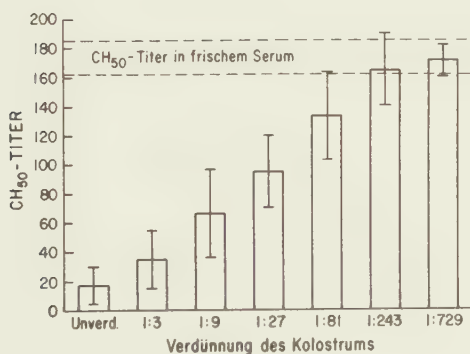


Abb. 33: Antikomplementäre Aktivität im Kolostrum von 5 Kühen ($\bar{x} \pm s$)

i. Fixation von Komplement C3 an die Oberfläche von E. coli

Wie bereits in der Literaturbesprechung erwähnt, ist die Fixation gewisser Komplementkomponenten an die Zellwand eindringender Erreger von entscheidender Bedeutung für das weitere Schicksal der Mikroorganismen. Insbesondere die Fixation von aktiviertem Komplement C3 ist für den Verlauf einer Infektion in mehrfachem Sinne bedeutsam. Als Opsonin ist aktiviertes und gebundenes C3b zusammen mit IgG verantwortlich für den Kontakt zwischen Mikroorganismen und phagozytierenden Zellen und beeinflusst auf diesem Wege direkt die Phagozytoserate der Leukozyten. Andererseits ist gebundenes C3b auch Teil der C5-Konvertase des klassischen Reaktionsweges und damit verantwortlich für die Aktivierung der späteren Komponenten. Zum dritten ist gebundenes C3b auch Teil der C3-Konvertase des alternativen Reaktionsweges. Dieser Feed back und Verstärkermechanismus führt in der Folge zu einer lawinenartigen Aktivierung späterer Komponenten. Die Fixation von aktiviertem C3 ist damit das wahrscheinlich entscheidende Ereignis im Verlaufe einer Erregerinvasion und ihr Ausmass dürfte in engem Zusammenhang mit dem weiteren Schicksal der Erreger stehen.

In einem nächsten Experiment wurde deshalb direkt die Menge von aktiviertem C3, das an die Zellwand von zwei verschiedenen E. coli Stämmen gebunden wurde, gemessen. Für diese Quantifizierung kam eine Modifikation des bereits früher für die Bestimmung gebundener Immunglobuline beschriebenen ELISA zur Anwendung (117). Die technischen Einzelheiten des Testes sind in Anhang 6 ausführlich beschrieben. Als Teststämme wurden wiederum die beiden E. coli Stämme "Lilly" und "12795" verwendet, da insbesondere die Frage interessierte, ob ihre unterschiedliche Serumempfindlichkeit mit der Menge von gebundenem C3 in Beziehung steht. In diesem Zusammenhang seien nochmals kurz die in Abb. 17 beobachteten Unterschiede bezüglich ihrer Fähigkeit zur Aktivierung des Komplementsystems im Blutserum in Erinnerung gerufen, aus denen hervorging, dass

der serumresistente Stamm (12795) deutlich mehr Komplement "verbraucht" hatte als der serumempfindliche Stamm (Lilly).

Die Fixation von C3b an die beiden E. coli Stämme nach Inkubation in gepooltem Blutserum von 8 Kühen ist in Abb. 34 dargestellt. Es ist daraus ersichtlich, dass die Inkubation in Seren, die vorgängig hitzeinaktiviert oder mit 10 mM EDTA versetzt worden waren, erwartungsgemäss zu keiner Fixation von C3b geführt hat. Die ELISA Extinktionswerte lagen in derselben Grössenordnung wie diejenigen der serumfreien Kontrolle.

Die Inkubation in unbehandeltem Blutserum dagegen führte bei beiden Stämmen zur Fixation von C3b an ihrer Oberfläche. Allerdings bestand ein deutlicher Unterschied in der Quantität von gebundenem C3b in dem Sinne, dass der serumempfindliche Stamm eine deutlich grössere Menge C3b fixiert hatte. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass der serumresistente Stamm während der Inkubation mehr Komplement verbraucht (Abb. 17) hatte, war dieser Befund etwas unerwartet. Er bestätigt die Auffassung, dass Komplementaktivierung und -fixation, verstanden als Bindung von aktiviertem C3 an die Oberfläche, nicht gleichgesetzt werden können. Offenbar besitzt der serumresistente Stamm wohl die notwendigen Strukturen, um das Komplementsystem zu aktivieren, gleichzeitig ist er aber auch in der Lage, sich gegen die Folgen dieser Aktivierung im Sinne der C3-Bindung bis zu einem gewissen Grad zu wehren. Diese Ansicht steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von anderen Autoren, die zeigen konnten, dass Stämme mit einer Kapsel deutlich weniger C3 binden und zu einem geringeren Grad phagozytiert werden (46).

Nach Blockierung des klassischen Reaktionsweges mit Mg-EGTA war der serumresistente Stamm nicht mehr in der Lage, C3b zu binden, während dies beim serumempfindlichen Stamm noch immer, in allerdings reduziertem Ausmass und nur nach Inkubation in 1:10 verdünntem Serum der Fall war. In 50%-igem Serum verhindern offenbar antikomplementäre Faktoren die Kom-

plementfixation. Diese Befunde sind in dreifacher Hinsicht zu interpretieren. Zum ersten bestätigen sie die Beobachtungen beim Menschen, dass ein funktionierender klassischer Reaktionsweg zu einer deutlich erhöhten Fixation von Komplement führt. Zum zweiten wird klar, dass die Zellwand der Erreger von Bedeutung ist für das Ausmass der Komplementbindung und dass in dieser Hinsicht offensichtlich beträchtliche Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen bestehen. Es stellt sich natürlich auch die Frage, ob die Unfähigkeit des serumresistenten Stammes, Komplement auf dem alternativen Reaktionsweg zu binden, direkt für seine Serumresistenz verantwortlich zu machen ist. Dies ist an einer grösseren Zahl unterschiedlicher Stämme zu überprüfen.

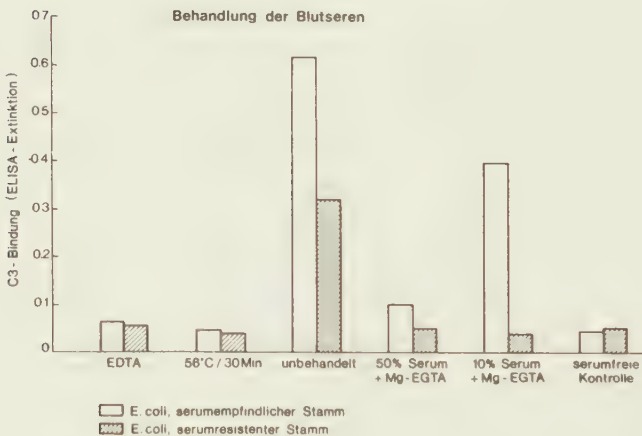


Abb. 34: Fixation von C3b an die Oberfläche eines serumempfindlichen und eines serumresistenten *E. coli* Stammes nach Inkubation in Blutserum

Die Inkubation der beiden Erreger in frischem Milchserum aus gesunden Vierteln (Abb. 35) führte nur im Falle des serumempfindlichen Stammes zu einer ganz geringen C3-Fixation und dies nur bei intaktem klassischem Reaktionsweg. Das geringe Ausmass lässt es zudem als fraglich erscheinen, ob diese C3-Fixation für die Opsonierung ausreichend ist.

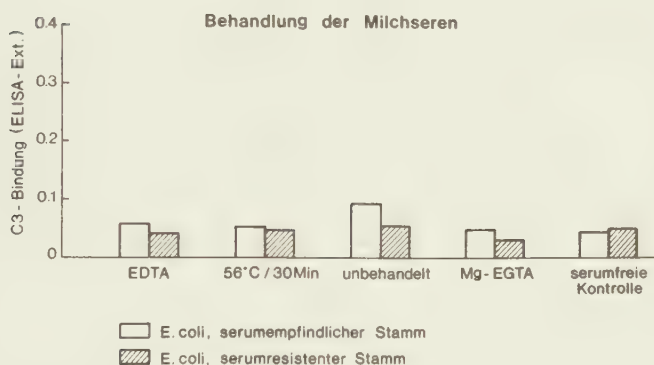


Abb. 35: Fixation von C3b an die Oberfläche eines serumempfindlichen und eines serumresistenten *E. coli* Stammes nach Inkubation in Milchserum aus gesunden Vierteln

Die Opsonierung in Milchserum aus akut erkrankten Vierteln (Abb. 36) führte zu einem ähnlichen Ergebnis wie die Opsonierung in Blutserum. Der Unterschied bestand eigentlich nur im Ausmass der C3-Fixation und in der Tatsache, dass nach Blockierung des klassischen Reaktionsweges mit Mg-EGTA bei keinem der beiden Stämme eine Fixation von C3 nachweisbar war. Dieses Ergebnis war zwar für den serumresistenten Stamm erwartet worden, war aber beim serumempfindlichen Stamm doch über-

raschend. Ob die ausbleibende C3-Bindung nach Blockierung des klassischen Reaktionsweges auf der Präsenz von antikomplementärer Aktivität oder auf dem Fehlen einzelner Komponenten im Aktivierungsteil des alternativen Reaktionsweges beruht, konnte nicht abgeklärt werden. Unabhängig davon bedeutet dieser Befund, dass komplementbedingte Opsonierung und Lyse in der Milch nur via den klassischen Reaktionsweg stattfinden kann und dass damit einer der natürlichen, nicht an die Präsenz von Antikörpern gebundenen Abwehrmechanismen ausfällt.

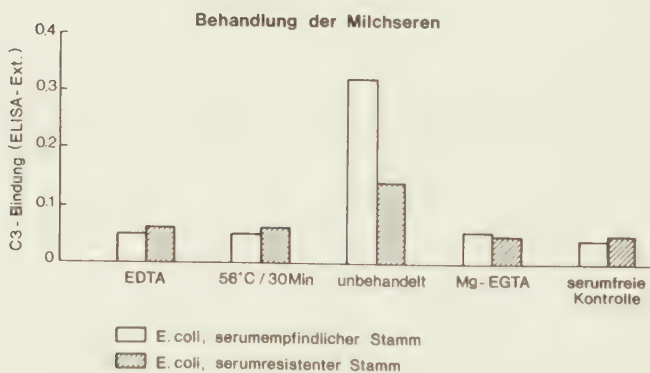


Abb. 36: Fixation von C3b an die Oberfläche eines serumempfindlichen und eines serumresistenten *E. coli* Stammes nach Inkubation in Milchserum aus akut erkrankten Vierteln

k. Einfluss der Komplementfixation auf die Phagozytose- rate von Milchleukozyten

In der Milchdrüse ist unter natürlichen Verhältnissen die Auseinandersetzung von eindringenden Erregern mit phagozytierenden Zellen letztlich entscheidend für das weitere Schicksal der Mikroorganismen. Der Phagozytoseprozess und das anschließende intrazelluläre Abtöten der Erreger sind unbestrittenermaßen die wichtigsten und effektivsten Abwehrmechanismen in der Milchdrüse. Um den Einfluss von Komplement auf diese Vorgänge zu untersuchen und die Bedeutung der Komplement-vermittelten Opsonierung im Mastitisgeschehen besser zu verstehen, wurden verschiedene Phagozytoseexperimente mit Milchleukozyten durchgeführt.

Die Isolierung und Präparation der Leukozyten erfolgte nach der in Anhang 4 ausführlich beschriebenen Methode. Als Mass für die phagozytische Aktivität wurde die Reduktion von Nitroblautetrazolium (NBT) gewählt (116). Das gelbe NBT wird durch Superoxid Anionen zu blauvioletter unlöslicher Formazan reduziert. Die NBT-Reduktion ist damit ein Mass für die Produktion von Superoxid Anionen und direkt abhängig vom oxidativen Metabolismus innerhalb des Phagosoms. Im Falle der Phagozytose von *E. coli* ist NBT-Reduktion zudem gleichbedeutend mit intrazellulärem Abtöten der Erreger. Die Einzelheiten der Methodik, wie sie in den nachfolgenden Versuchen zur Anwendung kam, sind in Anhang 5 ausführlich beschrieben.

Die beiden gleichen *E. coli* Stämme, die schon für die Untersuchungen zur Komplementfixation Verwendung fanden, wurden auch für die Phagozytoseexperimente verwendet. Es stand dabei vor allem die Frage im Vordergrund, ob Parallelen zu finden sind zwischen der Komplementfixation an der Erregeroberfläche und der Phagozytoserate.

In einem ersten Experiment wurden die beiden Stämme in

unterschiedlich vorbehandeltem, gepooltem Blutserum von 8 Kühen opsoniert und anschliessend mit Milchleukozyten zusammengebracht. Der Einfluss dieser verschiedenen Opsonierungsverfahren auf die Phagozytose ist in Abb. 37 dargestellt. Es ist daraus ersichtlich, dass NBT-Reduktion und damit Phagozytose bis zu einem gewissen Grad in allen Proben unabhängig von der Art der Opsonierung und selbst in der serumfreien Kontrolle stattgefunden hatte. Es dürfte sich dabei um ein zufälliges Aufeinandertreffen von Erregern und phagozytierenden Zellen handeln und es ist klar, dass auch dadurch die Phagozytose in Gang gesetzt werden kann. Erstaunlicherweise hatte die Opsonierung der Erreger nur mit Antikörpern, wie das für die EDTA-behandelten und die hitzeinaktivierten Seren galt, nicht zu einer gesteigerten NBT-Reduktion geführt. Die gemessenen

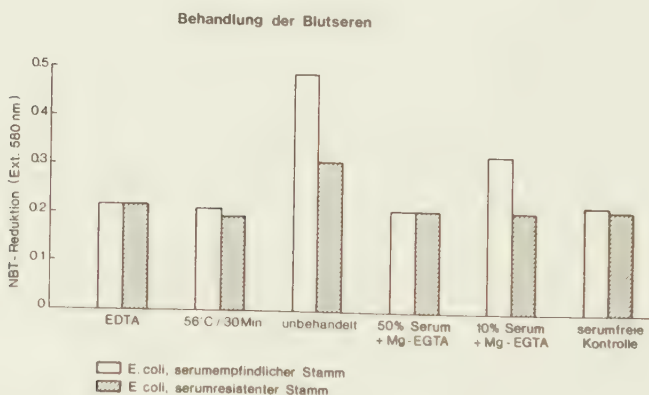


Abb. 37: Einfluss der Opsonierung eines serumempfindlichen und eines serumresistenten *E. coli* Stammes in unterschiedlich behandelten Blutseren auf die Phagozytose von Milchleukozyten

Werte waren nicht höher als bei der serumfreien Kontrolle. Erhöhte NBT-Reduktion konnte beim serumempfindlichen Stamm nach Opsonierung in unbehandeltem Blutserum und nach Blockierung des klassischen Komplementreaktionsweges beobachtet werden. Wie schon bei der Messung der C3-Fixation festgestellt wurde (Abb. 34), hat die Erhöhung des Serumanteils auf 50% nicht zu einer gesteigerten NBT-Reduktion Anlass gegeben und es ist anzunehmen, dass auch die gleiche Ursache für dieses Phänomen vorliegt.

Der serumresistente Stamm bewirkte nur nach Inkubation in frischem, unbehandeltem Serum eine Erhöhung der NBT-Reduktion. Diese war jedoch deutlich geringer als beim serumempfindlichen Stamm. Nach Zugabe von Mg-EGTA war die Aktivität nicht mehr verschieden von derjenigen nach Opsonierung in Serum, dessen Komplementaktivität mit EDTA oder durch Erhitzen zerstört wurde. Diese Ergebnisse sind wiederum nicht verschieden von der nichtopsonierten Negativkontrolle.

Die Opsonierung der beiden Erreger mit Milchserum aus gesunden Vierteln und die anschliessende Bestimmung der NBT-Reduktion im Phagozytoseexperiment (Abb. 38) zeigt ebenfalls, dass eine identische "Basisphagozytose" bei beiden Stämmen und unabhängig von der Art der Opsonierung stattgefunden hat. Geringgradig erhöht war die NBT-Reduktion nur beim serumempfindlichen Stamm, wenn dieser in unbehandeltem Milchserum, d.h. bei intaktem klassischem Komplementreaktionsweg, opsoniert wurde.

Die Opsonierung der beiden Stämme in Milchserum aus akut erkrankten Vierteln und die anschliessende Bestimmung der NBT-Reduktion im Phagozytoseversuch (Abb. 39) führte zu einem ähnlichen Ergebnis wie nach Opsonierung in Blutserum (Abb. 37). Ein Unterschied bestand nur insofern, dass nach Blockierung des klassischen Reaktionsweges mit Mg-EGTA keine über den Basiswert hinausgehende NBT-Reduktion mehr feststellbar war.

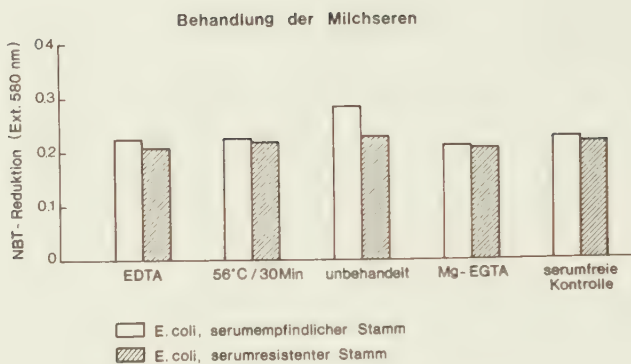


Abb. 38: Einfluss der Opsonierung eines serumempfindlichen und eines serumresistenten *E. coli* Stammes in unterschiedlich behandelten Milchseren aus gesunden Vierteln auf die Phagozytose von Milchleukozyten

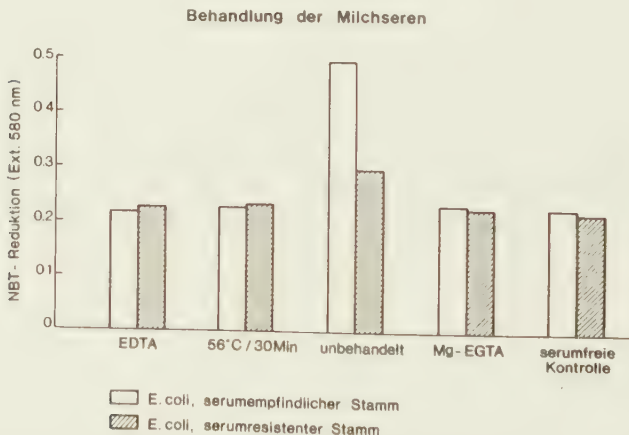


Abb. 39: Einfluss der Opsonierung eines serumempfindlichen und eines serumresistenten *E. coli* Stammes in unterschiedlich behandelten Milchseren aus akut erkrankten Vierteln auf die Phagozytose von Milchleukozyten

Von besonderem Interesse war natürlich ein Vergleich der Ergebnisse der Phagozytoseversuche (Abb. 37,38,39) mit den Messungen der Komplementfixation an die Oberfläche der Erreger (Abb. 34,35,36). Bei diesem Vergleich fällt auf, dass eine über den Basiswert hinausgehende Phagozytoserate nur dann vorhanden war, wenn an der Oberfläche der Erreger auch gebundenes C3b nachweisbar war. Dies bedeutet, dass ein Ansteigen der NBT-Reduktion absolut parallel verläuft mit der Bindung von C3b an die Oberfläche der Erreger. Damit ist gesichert, dass Komplement auch beim Rind für die Aktivierung des oxidativen Metabolismus im Phagosom verantwortlich ist. Dies wiederum unterstreicht die Bedeutung der Komplement bedingten Opsonierung für die Phagozytose und damit für die Abwehr eindringender Erreger.

4. Diskussion

Die Ausarbeitung einer optimalen Methode zur Bestimmung der hämolytischen Komplementaktivität im Rinderserum erwies sich als recht zeitraubendes Unternehmen. Bedingt durch die Vielzahl von Faktoren, die das Endergebnis beeinflussen, war es notwendig, die wichtigsten Parameter in einer beträchtlichen Anzahl von Vorversuchen zu standardisieren.

In diesen Voruntersuchungen hat sich gezeigt, dass die Probenhandhabung und deren Aufbewahrung von ausschlaggebender Bedeutung sind, wenn reproduzierbare Ergebnisse erhalten werden sollen. Proben, von denen nicht genau bekannt ist, wie sie gewonnen, zubereitet und aufbewahrt wurden, sind ungeeignet für die Bestimmung hämolytischer Aktivität und geben in der Regel keine brauchbaren Resultate.

Auf Grund der gemachten Erfahrungen ist eine Koagula-

tionszeit von einer Stunde bei Zimmertemperatur und anschliessendes Aufbewahren in einem Eisbad ein Verfahren, welches nicht zu einem messbaren Abfall der Aktivität führt. Die Serumgewinnung durch Zentrifugation soll jedoch nicht später als drei Stunden nach Entnahme erfolgen. Wird die Aktivität nicht unmittelbar daran anschliessend bestimmt, so sind die Proben möglichst rasch einzufrieren. Wird die Aktivitätsmessung innerhalb von drei Wochen durchgeführt, so ist Einfrieren bei -30°C ausreichend. Bei längeren Aufbewahrungszeiten empfiehlt sich die Lagerung bei -70°C . Einmal aufgetaute Proben sind möglichst rasch zu untersuchen und können nicht wieder eingefroren werden.

Weitere Faktoren, die sich bei der Bestimmung als kritisch erwiesen haben, sind die Salzkonzentration der Pufferlösungen, die Konzentration der sensibilisierten Erythrozyten, die Sensibilisierung der Erythrozyten und die Inkubationszeit der eigentlichen Testreaktion.

Die relativ niedrige Salzkonzentration von 0.05 M der Pufferlösung führte zu einem deutlichen Anstieg der Sensitivität des Testes. Obwohl diese Konzentration im Vergleich zu Literaturangaben erheblich niedriger ist, traten keine Probleme auf bezüglich spontaner Hämolyse und die Haltbarkeit der Erythrozyten-Suspension war nur unwesentlich reduziert. Spontane Hämolyse in einem störenden Ausmass war erst bei relativen Salzkonzentrationen unterhalb von 0.0075 M feststellbar.

Die Senkung der Erythrozyten-Konzentration von 2% auf 1% führte zu einem Anstieg der CH₅₀-Titer auf ziemlich genau den doppelten Wert. Auf Grund des Reaktionsmechanismus war dies grundsätzlich erwartet worden. Zusätzlich hat sich jedoch gezeigt, dass auch die Reproduzierbarkeit des Testes besser wurde. Die Ursache dafür ist nicht bekannt. Bei Verwendung der 2% -igen Erythrozyten-Suspension musste das Reaktionsgemisch vor der photometrischen Bestimmung verdünnt werden, um gemessen werden zu können. Es ist möglich, dass dieser zusätzliche

Pipettierschritt für die grössere Variation verantwortlich war.

Die Sensibilisierung der Meerschweinchen-Erythrozyten wurde mit gepooltem Serum von 8 Kühen durchgeführt. Die Verwendung verschiedener Konzentrationen eines Serumpools hat nur einen geringen Einfluss auf die Titerhöhe, sofern die Erythrozyten nach der Inkubation mindestens dreimal gewaschen werden. Wird dieser Schritt unterlassen, so führen Serumkonzentrationen über 2% zu einem deutlichen Titerabfall. Durch Verwendung einer ungewöhnlich hohen Serumkonzentration von 5% und anschliessendem intensivem Waschen konnten unserer Meinung nach auch die Probleme der Erythrozytenagglutination umgangen werden.

Für den Vergleich zweier CH50-Titer ist eine absolut identische Testdurchführung Grundbedingung. Da dies aus einleuchtenden Gründen nicht immer gewährleistet ist, empfiehlt es sich, mit jedem Test ein gepooltes Standardserum mit bekanntem Titer mitlaufen zu lassen. Dieses Standardserum ist in möglichst vielen Aliquots einzufrieren, so dass jedes Mal ein frischer Standard zur Verfügung steht. Die Resultate jedes Testes sind dann mit Hilfe dieses Standards zu adjustieren. Damit lassen sich Variationen in der Erythrozyten-Suspension oder Veränderungen, die durch die Alterung der Erythrozyten bedingt sind, sowie Variationen in den Inkubationszeiten vernachlässigen.

Die Inkubationszeit erwies sich als einer der kritischen Faktoren für die Reproduzierbarkeit. Wenn sie kürzer als 90 Minuten war, so führte dies zu einer erhöhten Streuung der CH50-Werte. In dieser Zeit sind die Reaktionen offenbar noch nicht vollständig abgelaufen und der Einfluss geringer Temperaturunterschiede auf die enzymatischen Reaktionen führt zu unterschiedlichen Resultaten. Werden Testzeiten von mehr als 100 Minuten eingehalten, so wird die Reproduzierbarkeit deutlich besser.

Die Verwendung des Titertek ELISA Readers für die Bestimmung der Extinktion von Hämoglobin hat sich ausgezeichnet bewährt. Ohne diese Messapparatur wären die fast 30 000 einzelnen Bestimmungen wohl kaum durchführbar gewesen.

Die hämolytische Aktivität, gemessen als CH50-Titer mit dem von uns verwendeten Testsystem, ergab für normales Rinder-serum Werte um 180. Dies zeigt, dass auch beim Rind durch die Wahl eines geeigneten Testsystems CH50-Titer erhalten werden können, die sich mit denjenigen bei anderen Tierarten oder beim Menschen durchaus vergleichen lassen.

Wie beim Menschen benötigt der klassische Reaktionsweg des Komplementsystems des Rindes ebenfalls Kalzium und Magnesium, um ablaufen zu können. Die Zugabe von 10 mM EDTA zu den Seren blockiert deshalb jegliche Aktivität, ebenso wie das Erhitzen der Seren auf 56 C während 30 Minuten. In einzelnen Milchseren dagegen waren 10 mM EDTA nicht ausreichend, um die hämolytische Aktivität zu blockieren. Die Konzentration wurde deshalb in allen Tests auf 30 mM erhöht, wenn die Aktivität in Milchserum blockiert werden sollte.

Die selektive Blockierung des klassischen Reaktionsweges wurde erreicht durch Zugabe von 10 mM EGTA zusammen mit 4mM MgCl . Diese Mischung bindet selektiv Kalzium und blockiert damit den klassischen, nicht aber den alternativen Reaktionsweg, da für seine Aktivierung nur Magnesium notwendig ist. Diese Behandlung der Seren führte zwar nicht zu einer Abnahme der CH50-Titer; der hämolytische Prozess verlief jedoch deutlich langsamer. Dieses Phänomen wurde auch beim Menschen beobachtet und bestätigt die Ansicht, dass der klassische Reaktionsweg deutlich rascher zur Komplementaktivierung führt als dies via den alternativen Weg möglich ist.

Die Verwendung paariger Milchproben eines gesunden und eines erkrankten Viertels desselben Tieres hat einmal mehr gezeigt, dass der Informationswert solcher Versuchs- und Kon-

trollproben deutlich grösser ist, als wenn die beiden Proben von verschiedenen Tieren stammen. Ein grosser Teil der für Variationen zwischen den beiden Proben verantwortlichen Faktoren ist dadurch standardisiert und für beide Proben identisch. Diese interne Kontrolle hat sich besonders bei den Proben subklinisch erkrankter Viertel bewährt, wo andernfalls kaum Unterschiede zwischen erkrankten und gesunden Vierteln hätten gezeigt werden können. Bei den Tieren mit schweren akuten Mastitiden sind die Unterschiede zwischen den Proben ohnehin deutlich grösser, so dass der Vorteil paariger Proben des gleichen Tieres nicht mehr so offensichtlich ist.

Die Ergebnisse sind so zu interpretieren, dass sowohl eine akute wie auch eine chronische Entzündung zu einem Ansteigen der Serum-Albumin- und der Komplement-C3-Konzentrationen in der Milch der betroffenen Viertel führt. Der Anstieg für beide Parameter verläuft ziemlich synchron und auch das Ausmass ist ungefähr gleich. Es darf deshalb davon ausgegangen werden, dass auch C3 auf passivem Wege in die Milch gelangt, wie dies für Serum-Albumin gezeigt werden konnte (59).

In Übereinstimmung mit allen bisherigen Berichten konnten wir im Milchserum normaler Viertel keine hämolytische Aktivität nachweisen. Ob dieses völlige Fehlen von Komplementaktivität auf zu niedrige Konzentrationen einzelner Komponenten oder auf die Präsenz antikomplementärer Faktoren zurückzuführen ist, ist nicht klar. Die niedrigen C3-Konzentrationen sprechen eher für die erste Theorie, während das Prozonephänomen in den Milchseren der akut erkrankten Viertel auf die Anwesenheit von Inaktivatoren oder Inhibitoren hinweist. Wahrscheinlich handelt es sich nicht um ein isoliertes Geschehen sondern eher um eine Kombination verschiedener Ursachen. Zur gerauen Abklärung dieses Phänomens und zur Identifikation der Ursache sind allerdings weitere Experimente mit Verwendung gereinigter Präparationen einzelner Komponenten notwendig.

Das Fehlen hämolytischer Komplementaktivität in einzelnen Milchseren von Kühen mit akuten Mastitiden war nicht erwartet worden, waren doch einige dieser Proben offensichtlich grobsinnlich verändert und enthielten deutlich erhöhte Serum-Albumin- und C3-Konzentrationen. Es wird von Interesse sein, abzuklären, ob es sich dabei um wirkliche Unterschiede zwischen verschiedenen Kühen handelt oder ob diese Unterschiede mit dem Zeitpunkt der Probenentnahme zusammenhängen. Weiter wird in diesem Zusammenhang auch abzuklären sein, ob eine Beziehung zwischen den CH50 Titern im Milchserum und dem weiteren Verlauf der Erkrankung besteht.

Die Untersuchungen der Komplementaktivität in den kolostralen Milchproben ergab ebenfalls einige interessante Ergebnisse. Es war zwar bekannt, dass die bakterizide Aktivität im Kolostrum nicht überwältigend ist und dass erst die Zugabe von frischem oder hitzeinaktiviertem Serum zu einem deutlichen Anstieg der bakteriziden Aktivität führt (21,122,143). Kürzlich berichteten allerdings ECKBLAD et al.(48), dass sie hämolytische Aktivität in 9 von 10 Kolostrumproben nachweisen konnten, dies zudem mit einem deutlich weniger empfindlichen Nachweissystem. Es scheint im Lichte unserer Ergebnisse wahrscheinlich, dass zumindest ein Teil der von ihnen untersuchten Kühe eine subklinische Mastitis aufwies und dass es weniger das Kolostrum an und für sich als vielmehr die Mastitis war, die für die hämolytische Aktivität verantwortlich zeichnete. Unsere Untersuchungen im Kolostrum von subklinisch erkrankten Vierteln scheinen diese Ansicht zu bestätigen.

Worauf diese niedrige oder fehlende Aktivität in normalen Kolostrumproben zurückzuführen ist, ist zur Zeit noch nicht klar. Die hohen C3-Konzentrationen (etwa 40% des Blutserumspiegels) weisen darauf hin, dass entweder nur einzelne Komponenten im Kolostrum in derartigen Mengen angereichert werden oder dass auch Inhibitoren und Inaktivatoren im selben oder noch ausgeprägterem Masse im Kolostrum vorhanden sind.

In diesem Zusammenhang ist natürlich einmal mehr in Erinnerung zu rufen, dass hämolytische Aktivität die Präsenz und Funktion aller Komponenten verlangt, während der Grossteil der biologisch bedeutsamen Funktionen von der Aktivierung der Komponenten bis zu C5 abhängen. Das Fehlen hämolytischer Aktivität im Kolostrum ist deshalb nicht gleichbedeutend mit Abwesenheit biologischer Aktivität. Die Verwendung gereinigter Präparationen sollte es auch hier ermöglichen, abzuklären, bis zu welchem Schritt Komplementaktivierung im Kolostrum stattfinden kann.

Trockenstellen und Trockenzeit sind in mehreren Beziehungen von Besonderheit und erst in den letzten Jahren wurde dieser Phase gebührende Aufmerksamkeit geschenkt. Dieses Interesse beruht vorwiegend auf der Beobachtung, dass das Infektionsrisiko zu Beginn der Trockenzeit deutlich höher ist als zu jedem anderen Zeitpunkt während der Laktation (172). Diese erhöhte Infektionsgefahr beschränkt sich allerdings nur auf gram-positive Erreger, während Erkrankungen, verursacht durch *E. coli*, nur sehr selten vorkommen. Diese Tatsache sowie die neueren Untersuchungen zu den Veränderungen des Zellbildes während der Trockenzeit (87,103) liessen es als wahrscheinlich erscheinen, dass auch Veränderungen bezüglich Komplementaktivität zu erwarten waren.

Der rasche und hohe Anstieg der Komplementaktivität bereits zwei Tage nach dem Trockenstellen ist eindrucklicher als dies je bei akuten Mastitiden gesehen werden konnte. Aus den Erfahrungen im Zusammenhang mit Bakterizidie-Untersuchungen ist anzunehmen, dass diese Konzentrationen durchaus ausreichend sind für bakteriolytische Aktivität. Ob damit Komplement der Faktor ist, der für das nur seltene Auftreten von coliformen Mastitiden in dieser Zeit verantwortlich ist, scheint möglich, muss aber noch in weiteren Experimenten endgültig abgeklärt werden.

Der Befund, dass die Aktivität des alternativen Reak-

tionsweges in Milch immer etwa die Hälfte der totalen Aktivität ausmacht, liefert einen Hinweis dafür, dass Faktor B eine der limitierenden Komponenten ist und dass dadurch der Verstärkungsmechanismus relativ rasch erschöpft ist. Ob das völlige Fehlen alternativer Reaktionsweg-Aktivität in der ersten Woche der Trockenzeit für das Angehen von Infektionen teilweise verantwortlich zu machen ist, ist noch offen. Sind bereits Antikörper gegen den eindringenden Erreger vorhanden, so dürfte das Fehlen der alternativen Aktivität nicht allzu schwer ins Gewicht fallen (118). Stehen jedoch keine Antikörper zur Verfügung, so ist es durchaus möglich, dass diesem Befund grössere Bedeutung zuzumessen ist.

Verschiedene Fragen stellen sich auch noch im Zusammenhang mit dem Prozonophänomen und seiner Bedeutung für die Effektivität komplementvermittelter Abwehrmechanismen. Auch wenn bakteriolytische oder hämolytische Aktivität noch in hohen Verdünnungen nachgewiesen werden können, so ist trotzdem nicht klar, ob diese hohen Titer im Falle eines Prozonophänomens überhaupt von biologischer Bedeutung sind. Es ist doch wohl anzunehmen, dass die Verhältnisse in den niedrigen Verdünnungen den Gegebenheiten in vivo eher entsprechen als das, was nach einer 100-fachen Verdünnung der Reaktionsgemische noch abläuft. Trifft dies zu, so würde ein Prozonophänomen für die Komplementaktivierung in vivo ebenfalls heissen, dass sie unterbrochen ist. Allerdings ist dazu einmal mehr zu erwähnen, dass der Ort der Unterbrechung in der Kaskade ausschlaggebend dafür ist, ob und welche Funktionen ausfallen.

Die Ergebnisse der Inkubation verschiedener gram-negativer Mastitserreger von unterschiedlicher Serumempfindlichkeit in frischem Rinderserum und die anschliessende Bestimmung des "Komplementverbrauchs" schienen auf den ersten Blick schwer verständlich zu sein. Der Befund, dass die serumempfindlichen Stämme, die bei Infektionsversuchen rasch eliminiert werden und nur leichte Entzündungserscheinungen verursachen, deutlich weniger Komplement aktivieren als die serumresistenten, hoch

pathogenen Stämme stand in Widerspruch mit der gängigen Ansicht, dass die Serumempfindlichkeit mit der Aktivierung des Komplementsystems korreliert sei. Diese Ansicht ist unter dem Gesichtswinkel der hier gezeigten Resultate zu revidieren und zu präzisieren. Die Frage der Serumempfindlichkeit ist nicht an die Fähigkeit der Erreger, mehr oder weniger Komplement aktivieren zu können gebunden. Der Zusammenhang liegt wahrscheinlich in der Fähigkeit, die aktivierten Komponenten an der Oberfläche zu binden oder sich eben gegen diese Bindung wehren zu können. Während die Fixation bei serumempfindlichen Stämmen offenbar leicht erfolgt, trifft dies für die meist eingekapselten, serumresistenten Stämme nicht im gleichen Mass zu. Entspricht diese These den Tatsachen, so funktioniert der serumresistente Stamm im gleichen Sinn wie die sogenannten "Fluid phase activators" wie Cobra Venom Faktor. Da bei solcher Komplementaktivierung natürlich auch Entzündungsmediatoren freigesetzt werden, würde dieses Phänomen auch die schweren Entzündungserscheinungen erklären (27).

Ähnliche Untersuchungen mit humanen E.coli Stämmen weisen ebenfalls darauf hin, dass gewisse Erreger in der Lage sind, sich gegen die Bindung der aktivierten Komplementkomponenten zur Wehr zu setzen (16,35,46,72,79,131,162,175,181,182,183).

Der Anstieg der hämolytischen Aktivität nach der Inkubation des serumempfindlichen Stammes in frischem Blutserum weist in eine ähnliche Richtung wie das bereits diskutierte Prozonephänomen. Durch die Fixation von Komplement an den Erreger werden auch die Regulatoren des Systems "verbraucht". Geschieht dies rascher als es für die Komponenten der Fall ist, kommt es zu einem relativen Anstieg der hämolytischen Aktivität.

Die Komplementmessungen während und nach experimentell induzierten Mastitiden geben etwas Einblick in die zeitlichen Abläufe und Zusammenhänge zwischen der Endotoxin-Exposition und den entzündlichen Reaktionen. Erwartungsgemäss kam es nach

der Endotoxin-Instillation zu einer Veränderung aller in diesen Experimenten bestimmten Parameter. Von Interesse sind jedoch die zeitlichen und quantitativen Unterschiede in den Reaktionen.

Das Nachhinken der Zellzahlen relativ zu den Veränderungen der anderen Parameter dürfte wahrscheinlich in dem Sinne auf einen "Artefakt" zurückzuführen sein, dass in der frühen Mastitisphase die Leukozyten nach der Migration ins Euter noch für einige Zeit an den Epithelien haften bleiben und dass die Zellzahlbestimmung in der Milch nur bedingt die wahren Verhältnisse wiedergibt (20,36,75).

Der Anstieg der Zellzahlen um einen Faktor 100 im Verlaufe der Mastitisinduktion ist deutlich ausgeprägter als der Anstieg der Serum-Albumin- und der Komplement-C3-Konzentrationen, die nicht einmal auf das Zehnfache der Ausgangswerte anstiegen. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die beiden Anaphylatoxine und Chemotaxine C3a und C5a, die durch die Komplementaktivierung gebildet werden, noch in Konzentrationen chemotaktisch aktiv sind, in denen sie die Gefäßpermeabilität nicht mehr zu beeinflussen vermögen (41,55,65,82,130,164,184). Für diese Ansicht spricht auch, dass bei den Experimenten mit unterschiedlichen LPS-Dosierungen trotz deutlich erhöhter Zellzahlen teilweise keine Veränderungen der Serum-Albumin- und C3-Konzentration gesehen wurden. Obwohl immer wieder postuliert, scheint es unwahrscheinlich, dass LPS direkt einen Einfluss auf die Zellmigration hat. In eigenen Experimenten war es nur möglich, Chemotaxis zu demonstrieren, wenn Endotoxin in frischem Serum inkubiert wurde. Endotoxin in serumfreier Umgebung war nie chemotaktisch aktiv für bovine Leukozyten. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass die Aktivierung des Komplementsystems für die Entwicklung der frühen Entzündungssymptome von ausschlaggebender Bedeutung ist. Ob dies allerdings nur zum Vorteil des Tieres geschieht, ist nicht eindeutig zu beantworten. Einerseits ist die Mobilisation zellulärer und humoraler Abwehrme-

chanismen sicher notwendig und von Vorteil. Ein guter Teil der irreversiblen Gewebeschäden wird andererseits aber ebenfalls durch diese Abwehrmechanismen verursacht. Dazu seien nur die Probleme der disseminierten intravaskulären Koagulopathie und die Schwierigkeiten mit dem Abtransport der Entzündungsprodukte am Ende einer Mastitis erwähnt. Insbesondere bei Infektionen mit Erregern, die zwar in der Lage sind, Komplement zu aktivieren, sich aber gleichzeitig gegen die Fixation von C3b zu wehren vermögen, ist es fraglich, ob Komplementaktivierung von einem gewissen Zeitpunkt an für den Makroorganismus wirklich noch von Vorteil ist. Untersuchungen an dekomplementierten Meerschweinchen und Kaninchen weisen ebenfalls auf diese Problematik hin (67,80).

Es war schon seit einiger Zeit vermutet worden, dass das Rinderserum beträchtliche Mengen von Inhibitoren und Inaktivatoren des Komplementsystems enthält (98). Das Ausmass der antikomplementären Aktivität und ihr direkter Nachweis wurden in diesen Untersuchungen allerdings erstmals gezeigt. Diese Aktivität ist in den Milchseren deutlich grösser als im Blutserum. Berücksichtigt man zudem, dass die Konzentrationen einzelner Komplement-Komponenten in der Milch nur ungefähr 3% der Blutserum Konzentration betragen, so muss vermutet werden, dass die Anwesenheit dieser Substanzen in der Milch anderen Gesetzmässigkeiten folgt, als dies zum Beispiel für C3 der Fall ist.

Die Frage ist offen, ob im Euter eine besondere antikomplementäre Substanz für diese Eigenschaften verantwortlich ist, oder ob einer oder mehrere der auch im Blutserum vorkommenden Inhibitoren und Inaktivatoren eine besondere Affinität für die Milchdrüse besitzen.

In weiteren Untersuchungen wird deshalb abzuklären sein, welcher Natur diese antikomplementären Substanzen sind und wo sie in den Ablauf der Komplementaktivierung eingreifen. Auf Grund dieser Ergebnisse wird sich dann zeigen, welche biologi-

sche Bedeutung ihnen in der Milchdrüse zukommt.

Die Bestimmung der Bindung von Komplement-C3 an die Oberfläche von verschiedenen *E. coli* Stämmen zeigte, dass Komplementaktivierung nicht synonym ist mit Komplementfixation. Im Unterschied zu den Experimenten zur Ermittlung der Fähigkeit einzelner Stämme, Komplement zu aktivieren, hat die direkte Bestimmung von gebundenem C3 gezeigt, dass serumempfindliche Stämme deutlich mehr C3 binden als serumresistente Stämme. Diese Resultate bestätigen die Vermutung, dass die Serumempfindlichkeit direkt mit der Menge fixierten, nicht aber mit der Menge aktivierten Komplements korreliert.

VERBRUGH et al. haben kürzlich an verschiedenen humanen Erregern die Zusammenhänge zwischen dem Vorhandensein einer Kapsel und der Fähigkeit, Komplement C3 zu binden, in mehreren Experimenten genau untersucht (176,177). Sie kamen zum Schluss, dass die Kapsel die Fixation von C3b weitgehend verhindern kann und dass die Kapsel in dem Sinne zu einer Virulenzsteigerung führt, dass die komplementbedingte Opsonierung des Erregers nicht in ausreichendem Masse stattfindet.

Die Feststellung, dass der serumresistente Stamm nicht in der Lage ist, Komplement via den alternativen Reaktionsweg zu fixieren, steht in Übereinstimmung mit Befunden aus der Humanmedizin, die ebenfalls zeigen, dass kapselhaltige Stämme nur in Anwesenheit von antikapsulären Antikörpern an der Oberfläche C3 fixieren (46,79,96,176). Frühere Experimente zur Bindung von Immunglobulin G durch *E. coli* nach Inkubation in Blut- oder Milchserum (117) haben gezeigt, dass serumresistente Stämme nach Inkubation in Blutserum deutlich weniger IgG gebunden haben als die serumempfindlichen. Die Inkubation in Milchserum hat nicht zu messbarer IgG-Bindung an den serumresistenten Stamm geführt. Diese Kombination erniedrigter IgG-Bindung mit der Unfähigkeit, Komplement via den alternativen Reaktionsweg zu fixieren, ist mit grosser Wahrscheinlichkeit für die Virulenz oder Pathogenität kapselhaltiger Erreger

hauptsächlich verantwortlich (35,72,79,96,131,137,175,182,183).

Die Ergebnisse der Phagozytoseversuche bestätigen diese Feststellung ebenfalls. Die NBT-Reduktion der Granulozyten verläuft völlig synchron mit dem Ausmass der Komplementfixation durch die phagozytierten Erreger. Diese Resultate stimmen auch mit Berichten aus der Humanmedizin überein, die klar demonstrieren, dass Komplementfixation und Phagozytoserate streng miteinander korrelieren (37,43,51,73,96,176).

Die wenigen Berichte in der Veterinärmedizin über die Zusammenhänge zwischen Kapselbildung von Erregern einerseits und ihrer Resistenz gegenüber dem Phagozytose-Prozess andererseits sind unter Berücksichtigung dieser Resultate wahrscheinlich nicht so direkt zu sehen, wie dies von den Autoren angenommen wurde (36,75,101,143,160,182,183,190). Es dürfte nicht die Kapsel direkt sein, die "antiphagozytäre" Eigenschaften aufweist, sondern der Mechanismus läuft mit grosser Wahrscheinlichkeit über ungenügende Opsonierung mit Komplementkomponenten ab.

Die Phagozytoseexperimente zeigen einmal mehr, dass Milchleukozyten durchaus in der Lage sind, ihre phagozytären Aufgaben zu erfüllen, sofern die Erreger opsoniert sind (149). In eigenen Experimenten wurde zwar ebenfalls festgestellt, dass sie nur etwa zwei Drittel der Kapazität von Leukozyten des Blutes aufweisen. Diese reduzierte Aktivität scheint jedoch noch immer ausreichend zu sein, um mit den relativ wenigen Erregern, die im Anfangsstadium einer Infektion im Euter vorhanden sind, fertig zu werden. Das entscheidende Ereignis im Verlaufe einer Erregerinvasion ist deshalb die Frage, ob die Erreger ausreichend mit Komplementkomponenten opsoniert werden oder nicht. Findet dieser Vorgang statt, so wird der Erreger auch rasch phagozytiert und unschädlich gemacht.

In Anbetracht der niedrigen oder fehlenden Komplementaktivität und der meist geringen Antikörperkonzentrationen im

Euter (21,36,118,119,122,128,143,160) auf der einen Seite und der teilweisen Fähigkeit der Erreger, sich gegen die Bindung sowohl von Immunglobulinen als auch von C3b zu wehren, auf der anderen Seite, erscheinen die Versuche zur Steigerung der körpereigenen Abwehrmechanismen im Rahmen des Mastitisgeschehens nicht als einfache Ziele. Es sind allerdings zur Zeit noch zu viele Fragen offen, bevor die Aussichten auf Erfolg endgültig beurteilt werden können.

D. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Präsenz und die Aktivität des Komplementsystems in der Milchdrüse des Rindes und dessen Bedeutung für die Abwehr von Infektionserregern untersucht. Dabei zeigte sich, dass in normaler Milch aus nicht erkrankten Vierteln keine hämolytische Aktivität feststellbar war. Lag jedoch eine Mastitis vor, so war auch Komplement in der Milch nachweisbar. Die Konzentrationen von Komplement-C3 und die hämolytische Aktivität stiegen dabei mit zunehmendem Schweregrad der Mastitis an. Allerdings erreichten die Konzentrationen auch bei hochgradigen Mastitiden nur ungefähr einen Drittel der im Blutserum gemessenen Werte. Im Trockensekret von mastitisfreien Tieren erreichte die Komplementaktivität Werte, wie sie sonst nur bei schweren akuten Mastitiden gefunden werden konnten. Im frühen Kolostrum waren zwar hohe Konzentrationen von Komplement-C3 feststellbar, die hämolytische Aktivität war dagegen nur sehr gering.

Die experimentelle Induktion von Mastitiden mit Endotoxin von *E. coli* ergab, dass Komplement in der frühen Phase der Mastitis als eine Folge der Endotoxin-Exposition mobilisiert wurde. Das Ausmass dieser Mobilisation war abhängig von der Endotoxinmenge. Die hämolytische Aktivität nach einer experimentellen Mastitis fiel innerhalb von 36 Stunden wieder auf normale Werte ab, obschon andere Parameter wie die Serum-Albumin-Konzentration, die Zellzahl und die Komplement-C3-Konzentration zu diesem Zeitpunkt noch deutlich erhöht waren.

In normaler Milch, im Trockensekret sowie auch im Kolostrum wurden antikomplementäre Faktoren nachgewiesen, die die Aktivierung des Komplementsystems zu behindern vermögen. Trockensekret war selbst in Verdünnungen von 1:1000 noch antikomplementär aktiv.

Die Untersuchungen über die Bedeutung von Komplement für die Erregerabwehr spielten sich in zwei Phasen ab. In einer ersten Versuchsreihe wurde direkt die Menge von C3 gemessen, die an die Oberfläche von serumempfindlichen und serumre-

sistenten Stämmen von *E. coli* gebunden wurde. Dabei zeigte sich, dass serumresistente Stämme nach Inkubation in Blutserum zwar viel Komplement zu aktivieren vermochten, an ihre Oberfläche jedoch nur wenig fixierten. Serumempfindliche Stämme dagegen aktivierten deutlich weniger Komplement und banden trotzdem grössere Mengen an ihre Oberfläche. Serumresistente Stämme besitzen offenbar Mechanismen, die sie dazu befähigen, sich gegen die Komplementfixation zur Wehr zu setzen. Die Aktivierung des Komplementsystems auf dem alternativen Reaktionsweg führte zudem bei serumresistenten Stämmen nicht zu einer messbaren C3-Fixation.

Nach Inkubation in Milch fixierten sowohl serumempfindliche wie auch serumresistente Stämme C3, dies jedoch nur bei intaktem klassischen Reaktionsweg. Auf dem alternativen Reaktionsweg war in Milch keine Komplementfixation möglich.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde abgeklärt, ob und wie die Fixation von C3 die Phagozytose von serumempfindlichen und serumresistenten Stämmen beeinflusst. Es konnte dabei eindeutig gezeigt werden, dass eine über das zufällige Mass hinaus gehende Phagozytose nur dann vorhanden war, wenn die zu phagozytierenden Erreger an ihrer Oberfläche C3 fixiert hatten. Der Aktivierung von Komplement und der Fixation von Komplement-C3 kommt damit in der Abwehr von Mastitiserregern eine zentrale Bedeutung zu.

Bestimmung der hämolytischen Komplementaktivität im Rinder-
serum

1. Präparation der Erythrozyten:

Material:

Meerschweinchen

Ketalar, Rompun

Alsever's Lösung:

Dextrose, wasserfrei	18.66 g
NaCl	4.18 g
Na-citrat	8.00 g
Zitronensäure	0.55 g
Aqua dest. ad	1000 ml

PBS:

NaCl	8.0 g
KH_2PO_4	0.2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	2.9 g
KCl	0.2 g
Aqua dest. ad	1000 ml

Calcium-Magnesium-Lösung:

$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	10.0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	4.0 g
Aqua dest. ad	100 ml

Gepooltes Serum von 5 Kühen, inaktiviert im Wasserbad bei
56 C während 30 Minuten.

Barbitalpuffer:

Lösung A:

NaCl	30.00 g
Na-diäthylbarbiturat	2.75 g
Aqua dest. ad	1400 ml

Lösung B:

Diäthylbarbitursäure	5.75 g
Aqua dest. (heiss) ad	500 ml

Lösungen A und B zusammengeben und Zugabe von 10ml
Ca-Mg-Lösung

Auffüllen mit Aqua dest. ad 2000 ml und Lagerung im
Kühlschrank.

Glukoselösung:

Glukose	100.0 g
Natriumazid	0.5 g
Aqua dest. ad	1000 ml

Komplementpuffer:

Barbitalpuffer	100 ml
Glukoselösung	250 ml
Gelatine	1 g
Aqua dest. ad	1000 ml

Methode:

1. Narkose des Meerschweinchens mit Ketalar (10 mg/kg) und Rompun (1 mg/kg).
2. Herzpunktion mit Spritze und aufgesetzter Kanüle und Aspiration von 4-8 ml Blut.
3. Kanüle entfernen und Zugabe von Blut zu gleicher Menge Alsever's Lösung in Zentrifugenröhrchen.
4. Dreimaliges Waschen mit je 20 ml Alsever's Lösung; (700 g; 5 Minuten).

5. Aufschwemmen der Erythrozyten in ca. 100 ml PBS.
6. Zugabe von 0.1 ml Ca-Mg-Lösung.
7. Zugabe von 10 ml gepooltem Serum.
8. Inkubation bei 37 C während 1-2 Stunden; auf Rotator oder Mischen in Abständen von 5-10 Minuten.
9. Zentrifugation wie oben und dreimaliges Waschen mit PBS.
10. Bestimmung des Erythrozytenvolumens in graduierstem Zentrifugenröhrchen.
11. Herstellen einer 1%-igen Erythrozytensuspension in Komplementpuffer.

Diese Suspension wird im folgenden EAC-Suspension (Erythrocyte-Antibody-Complex) genannt.

2. Durchführung der CH50-Bestimmung

Material:

Mikrotiterplatte, U-Boden, 96-Loch (12 Kolonnen, 8 Reihen)

Komplementpuffer

EDTA-Lösung:

EDTA	10 mM
Aqua dest	50 ml
Einstellen des pH auf 7.3 mit NaOH	
Aqua dest. ad	100 ml

Methode:

1. Herstellen einer Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Probe in Komplementpuffer. Die Art der Verdünnungsreihe ist beliebig. Verdünnungen von 1:10, 20, 40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320 haben sich bewährt.
2. Zugabe von 0.1 ml jeder Verdünnung in die Kolonnen 1 bis 10.

3. Zugabe von 0.1 ml Komplementpuffer in Kolonne 11 (Pufferkontrolle).
4. Zugabe von 0.125 ml Serum verdünnt 1:50 in Komplementpuffer in Kolonne 12 (50%-Lysekontrolle).
5. Zugabe von 0.05 ml der EAC-Suspension in die Kolonnen 1 bis 11.
6. Zugabe von 0.025 ml EAC-Suspension in die Kolonne 12.
7. Inkubation bei 37 C während 90 Minuten.
8. Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 0.1 ml EDTA-Lösung (4 C) in alle Löcher.
9. Zentrifugation während 3 Minuten bei 50 g.
10. Transferieren von 0.15 ml des Überstandes in eine Mikroti-terplatte mit flachem Boden.
11. Bestimmung der Hämoglobinkonzentration durch Messen der Extinktion bei 414 nm. Zur Eichung dient Kolonne 11.

3. Berechnung des CH50 Titers

Der CH50 Titer ist die Probenverdünnung, bei der 50 % der Erythrozyten lysiert werden. Er wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{CH50 Titer} = A1 + \frac{a (E1 - E2)}{(E1 - E50)}$$

Dabei ist:

E50: Extinktion der 50%-Lysekontrolle in Kolonne 12

E1: Nächst höherer Wert als E50

E2: Nächst tieferer Wert als E50

a: Differenz der Verdünnungen zwischen E1 und E2

A1: Verdünnung von E1

ANHANG 2

Bestimmung von bovinem Serum Albumin in Milchserum mittels Rocket-Immunelektrophorese (94)

Material:

Agarose mit niedriger Endosmose

Veronalpuffer: pH 8.6, 0.05 M

Natrium Barbitol	17.7 g
------------------	--------

Barbitol	2.6 g
----------	-------

NaCl	1.2 g
------	-------

Na-EDTA	0.7 g
---------	-------

Aqua dest. ad	2000 ml
---------------	---------

Milchserum unverdünnt

Antiserum des Kaninchens gegen bovines Serum Albumin

Objektträger 7 x 10 cm

Methode:

1. Zugabe von 1 g Agarose zu 100 ml Veronalpuffer
2. Erhitzen auf 90 C bis zur vollständigen Lösung
3. Abkühlen auf 50 C im Wasserbad
4. Zugabe von 2 ml Antiserum
5. Mischen
6. Aufgiessen von 18 ml auf jeden Objektträger
7. Abkühlen lassen
8. Ausstanzen von 12 Löchern mit 3 mm Durchmesser
9. Plazieren der Agarplatten in gekühlter Elektrophorese-Apparatur
10. Auffüllen der Elektrophoresekammern mit Veronalpuffer
11. Schliessen des Stromkreises mit Saugpapier
12. Zugabe von 10 μ l Probe oder Standard in jedes Loch
13. Elektrophorese für 18 Stunden bei 4 Volt/cm
14. Messen der Peakhöhe und Bestimmung der Serum-Albumin-Konzentration durch Korrelation mit Standardkurve

Anmerkung:

Wenn die Peaks nicht klar sichtbar sind, so empfiehlt sich die Färbung mit Comassie Blau.

ANHANG 3

Bestimmung der Komplement-C3-Konzentration in Blut- oder Milchserum mittels radialer Immunodiffusion

Material:

Agarose
Veronalpuffer (siehe Anhang 2)
Milchserum unverdünnt
Blutserum 1:10 verdünnt in Veronalpuffer
Antiserum des Kaninchens gegen bovines C3
Objektträger 7 x 10 cm
Verdünnungsreihe von gepooltem Rinderserum in Veronalpuffer als Standard

Methode:

1. Zugabe von 2 g Agarose zu 100 ml Veronalpuffer
2. Erhitzen auf 90 C bis zur vollständigen Lösung
3. Abkühlen auf 50 C im Wasserbad
4. Zugabe von 2 ml Antiserum
5. Mischen
6. Aufgiessen von 18 ml auf jeden Objektträger
7. Ausstanzen von 18 Löchern mit einem Durchmesser von 3 mm
8. Zugabe von 10 μ l Probe oder Standard
9. Plazieren des Objektträgers in feuchter Kammer für 48

Stunden

10. Messen des Durchmessers des Präzipitatringes und Berechnung der Komplement-C3-Konzentration in Prozent des gepoolten Standardserums

Anmerkung:

Wenn die Ringe ungenügend sichtbar sind, so empfiehlt sich die Färbung mit Comassie Blau.

ANHANG 4

Gewinnung und Präparation von Milchleukozyten für die Phagozytose-Experimente (83)

Material:

Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)

PBS mit 10 mM EDTA

EDTA Lösung, 100 mM

Zentrifugengläser, 200 ml

Eisbad

steriles, destilliertes Wasser

Methode:

1. Instillation von 150 ml dest. Wasser in gesundes Euterviertel
2. Nach 12 Stunden Gewinnung von 180 ml Milch in Zentrifugenglas mit 20 ml EDTA Lösung
3. Sofortiges Kühlen in Eisbad. Alle weiteren Schritte sind bei 4 °C durchzuführen
4. Zentrifugation der Zellen bei 500 g während 10 Minuten
5. Zweimaliges Waschen mit kalter PBS mit EDTA

6. Suspension der Zellen in kalter PBS
7. Bestimmung der Zellzahl
8. Bestimmung des Prozentsatzes lebender Zellen mittels Trypanblau-Exklusion. Die Zellsuspension ist für den Test nur geeignet wenn der Prozentsatz lebender Zellen grösser als 90% ist.
9. Bestimmung der Zahl der neutrophilen Granulozyten durch Differentialfärbung
10. Verdünnung der ursprünglichen Zellsuspension auf eine Konzentration von $5 \cdot 10^7$ lebende neutrophile Granulozyten

ANHANG 5

Bestimmung der Phagozytoserate von Milchleukozyten durch
Messung der Nitroblautetrazolium (NBT) Reduktion

Material:

- E. coli, $2 \cdot 10^8$ /ml, in PBS
- Milchleukozyten, $5 \cdot 10^7$ /ml in PBS
- Nitroblautetrazolium (NBT) 2 mg/ml in PBS, filtriert durch $0.45 \mu\text{m}$ Filter
- N-Ethylmaleimid, 1 mM in PBS
- Pyridin
- Blut- und Milchseren, verdünnt 1:5 in:
 1. PBS mit Ca und Mg
 2. PBS mit 10 mM EGTA und 4 mM Mg
 3. PBS mit 10 mM EDTA
 4. PBS mit Ca und Mg, inaktiviert bei 56 C während 30 Minuten
- Wasserbad

Kapelle

Silikon behandelte Glasröhrchen

Methode:

1. Zugabe von 0.5 ml E. coli Suspension in Glasröhrchen
2. Zugabe von 0.5 ml Blut- oder Milchserum
3. Inkubation bei 37 C während 30 Minuten
4. Zugabe von 0.2 ml NBT Lösung
5. Zugabe von 0.2 ml Leukozytensuspension
6. Inkubation bei 37 C während 20 Minuten. Die Zellen und Erreger werden in Suspension gehalten durch wiederholtes leichtes Schütteln.
7. Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 5 ml eisgekühlter N-Ethylmaleimid-Lösung
8. Zentrifugation von Zellen und Formazanpräzipitat bei 500 g während 10 Minuten
9. Überstand verwerfen
10. Suspension des Pellet in 4 ml Pyridin
11. Extraktion des Formazan durch kurzes Ultraschallen und Kochen in Wasserbad in Kapelle während 5 Minuten
12. Zentrifugation bei 500 g während 5 Minuten
13. Bestimmen der Extinktion des Überstandes im Photometer bei 580 nm gegen Pyridin

Anmerkung:

Alle Tests werden im Doppel geführt. Die Resultate werden als Extinktion/ 10^7 Leukozyten/ 20 Minuten in 4 ml Pyridin ausgedrückt.

ELISA für die Bestimmung von Komplement C3b an der Oberfläche von Erregern

1. Opsonierung:

Material:

E. coli, 2×10^8 /ml, inaktiviert in 4% Formalin, 3x gewaschen mit PBS.

Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS):

NaCl	8.0 g
KH_2PO_4	0.2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	2.9 g
KCl	0.2 g
Aqua dest. ad	1000 ml

frisches Blut- oder Milchserum

Magnesium-Calcium-Lösung:

$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	10.0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	4.0 g
Aqua dest. ad	100 ml

PBS mit Ca und Mg:

PBS mit 0.1% Ca-Mg-Lösung

Karbonatpuffer:

Na_2CO_3	1.59 g
NaHCO_3	2.93 g
NaN	0.2 g
Aqua dest. ad	1000 ml

Methode:

1. Zugabe von 1 ml E. coli Suspension zu 4.5 ml PBS mit Ca und Mg und 0.5 ml Frischserum
2. Inkubation bei 37 C während 60 Minuten.

3. Dreimaliges Waschen mit PBS
4. Suspendieren des Pellet in 5 ml Natriumkarbonat-Puffer
5. Ultraschallen während 30 Sekunden
6. Aliquotieren und Lagerung bei -70 C.

2. ELISA:

Material:

96-Loch Mikrotiterplatte mit flachem Boden

4% Glutaraldehyd Lösung in dest. H₂O

Waschlösung:

TWEEN-20 0.5 ml

PBS ad 1000 ml

Konjugatpuffer:

Waschlösung mit 0.1% humanem Serum Albumin

Konjugat:

Kaninchen-anti-Rind C3 konjugiert mit Peroxidase

Substratlösung:

Zitratpuffer, 0.1 M, pH 4.0 5 ml

H₂O₂ (2%) 20 μ l

ABTS (43.9 mg/ml) 25 μ l

Frisch zubereiten unmittelbar vor Gebrauch.

Stopplösung:

Flussäure (HF), 0.1 M

Methode:

1. Zugabe von 100 μ l Glutaraldehydlösung in jedes Loch der Mikrotiterplatte
2. Inkubation bei 4 C während 18 Stunden
3. Dreimaliges Waschen mit Aqua dest.
4. Zugabe von 100 μ l E. coli Suspension
5. Inkubation bei 37 C bis Suspension eingetrocknet (ca. 12 Stunden)

6. Dreimaliges Waschen mit Waschlösung
7. Zugabe von 100 μ l Konjugat verdünnt in Konjugatpuffer
Die geeignete Verdünnung ist im voraus zu bestimmen.
8. Inkubation bei 37 C während 1 Stunde
9. Dreimaliges Waschen mit Waschlösung
10. Zugabe von 150 μ l Substratlösung
11. Inkubation bei 37 C während 45 Minuten
12. Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 100 μ l Stop-
lösung
13. Bestimmen der Extinktion bei 405 nm

Anmerkungen:

Auf jeder Platte ist für jeden untersuchten Stamm eine Negativkontrolle (E. coli, nicht opsoniert) mitzuführen. Reagiert das Konjugat direkt mit dem Erreger, so ist das Konjugat vorgängig mit dem Erreger zu absorbieren. Ein Stamm mit deutlich positiver Reaktion nach Opsonierung in frischem Blutserum ist als Positivkontrolle mitzuführen.

E. LITERATURVERZEICHNIS

1. ACKER, G. and BRADE, V.
Activation of human complement by *Yersinia enterocolitica*:
Ultrastructural alterations and C3b-deposition
Zbl. Bakt. Hyg., 1. Abt. Orig. A 248:210-228, 1980.
2. ALEXANDER, J.W. and GOOD, R.G.
Fundamentals of clinical immunology
W.B. Saunders Comp. London, 1977, pp 80-89.
3. ATKINSON, J.P. and FRANK, M.M.
Complement
In: Clinical immunology, Vol 1
W.B. Saunders, Philadelphia, 1980, pp 219-271.
4. AUSTEN, K.F. and FEARON, D.T.
A molecular basis of activation of the alternative pathway of human complement
In: Advances in experimental medicine and biology, Vol. 120B,
Plenum Press, New York, 1979, pp 3-17.
5. AUSTEN, K.F.
Nomenclature of the alternative activating pathway of complement
Clin. exp. Immunol. 47:221-224, 1982.
6. BABIOR, B.M., KIPNES, R.S. and CURNITTE, J.T.
Biological defense mechanisms: The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent
J. Clin. Invest. 52:741-744, 1973.
7. BARRET, J.T.
Molecular immunology III: Complement
In: Basic immunology and its medical application
The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980, pp 109-125.
8. BARRET, J.T.
Immunochemistry and immunobiology of complement
Textbook of immunology, 3d ed.,
The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1978, pp 226-257.
9. BARTA, O. and BARTA, V.
Haemolytic assay of bovine serum complement
J. Immunol. Methods 1:363-374, 1972.
10. BARTA, O., BARTA, V., INGRAM, D.G. and HUBBERT, W.T.
Bactericidal activity of bovine fetal serum against smooth and rough strains of *Escherichia coli*
Am. J. Vet. Res. 33:731-740, 1972.
11. BARTA, O., NELSON, R.A. and KUO, C.Y.
Separation of six bovine complement components and one inactivator
Immunol. Commun. 5:75-86, 1976.

12. BARTA, O. and HUBBERT, N.L.
Testing of hemolytic complement components in domestic animals
Am. J. Vet. Res. 39:1303-1308, 1978.
13. BARTA, O.
Laboratory techniques of veterinary clinical immunology:
A review
Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 4:131-160, 1981.
14. BAUMGARTEN, A.
Physicochemical and biological features of complement
In: CRC Handbook Series in Clinical Laboratory Science
3:89-110, 1980.
15. BECKER, E.L. and WARD, P.A.
Chemotaxis
In: C.W. Parker, Clinical immunology, Vol 1.
W.B. Saunders, Philadelphia, 1980, pp 272-297.
16. BERTO R. and MENZEL J.
The interaction of opsonins with human polymorphonuclear leucocytes (PMN): 1. The influence of human complement (C) and IgG on ingestion and digestion of C-resistant *E. coli*
Z. Immunitätsforsch. 155:189-199, 1979.
17. BIANCO, C.
Plasma membrane receptors for complement
In: R.A. Good and S.B. Day, Comprehensive immunology, Vol. 2.
Plenum Medical Books, New York, 1977, pp 69-84.
18. BIANCO, C. and NUSSENZWEIG, V.
Complement receptors
Contemp. Top. Mol. Immunol. 6:145-176, 1977.
19. BÖHM, K.H. und MÜNDEL, U.
Peptidoglykan. Eine Übersicht
Zbl. Vet. Med. B 29:493-520, 1982.
20. BRAMLEY, A.J., GODINHO, K.S. and GRINDAL, R.J.
Evidence of penetration of the bovine teat duct by *Escherichia coli* in the interval between milkings
J. Dairy Res. 48:379-386, 1981.
21. BROCK, J.H., ORTEGA, F. and PINEIRO, A.
Bactericidal and haemolytic activity of complement in bovine colostrum and serum: Effect of proteolytic enzymes and ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA)
Ann. Immunol. (Inst. Pasteur) 126:439-451, 1975.
22. BROWN, D. and HOBART, M.J.
Complement and complement fixation
In: R.A. Thompson, Techniques in clinical immunology, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1981, pp 75-94

23. BROWN, E.J. and FRANK, M.M.
Complement activation
Immunology Today 2:129-134, 1981.
24. BROWN, K.R., DOUGLAS, H. and BRAUDE, A.I.
Prevention of death from endotoxin with antisera
J. Immunol. 106:324-333, 1971.
25. BRYAN, C.S.
Sensitization of *E. coli* to the serum bactericidal system and to lysozyme by ethyleneglycoltetraacetic acid
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 145:1431-1433, 1974.
26. BURGER, R., BITTER-SUERMAN, D., LOOS, M., and HADDING, U.
Insoluble polyanions as activators of both pathways of complement
Immunology 33:827-837, 1977.
27. CARROLL, E.J., JAIN, N.C., SCHALM, O.W. and LASMANIS, J.
Experimentally induced coliform mastitis: Inoculation of udders with serum-sensitive and serum-resistant organisms
Am. J. Vet. Res. 34:1143-1146, 1973.
28. CARROLL, E.J.
In vitro bactericidal reactions of serums and milks obtained from cows inoculated with selected serum-resistant and serum-sensitive coliform bacteria
Am. J. Vet. Res. 35:205-211, 1974.
29. CARROLL, E.J.
The role of lysozyme in killing and lysis of coliform bacteria in the bovine animal: 1. Serum and milk concentrations of lysozyme and susceptibility of coliform strains to its action
Vet. Microbiol. 4:61-72, 1979.
30. CARROLL, E.J.
The role of lysozyme in killing and lysis of coliform bacteria in the bovine animal: 2. Effect of absorbing serum with bentonite or bacteria
Vet. Microbiol. 4:73-84, 1979.
31. CHARLESWORTH, J.A., ENDRE, Z.H., PUSSELL, B.A., YASMEEN, D. and PEAKE, P.W.
Complement behavior in infectious mononucleosis: Possible mechanisms for the prevention of immune complex injury
J. Infect. Dis. 145:505-513, 1982.
32. CHENOWETH, D.E. and HUGLI, T.E.
Demonstration of specific C5a receptor on intact human polymorphonuclear leukocytes
Proc. Nat. Acad. Sci. 75:3943-3947, 1978.
33. CHESON, B.D. and MORRIS, S.E.
The role of complement and IgG in zymosan opsonization
Int. Arch. Allergy appl. Immunol. 66:48-54, 1981.

34. CLARK, W.R.
Immunity to infection
In: The experimental foundations of modern immunology
John Wiley & Sons, New York, 1980, pp 112-121.
35. CLEAR, P.H. and COID, C.R.
Phagocytic and bactericidal activity of human neutrophils
against two isolates of Group B Streptococci Type Ic of
differing pathogenicity
Br. J. exp. Path. 62:393-397, 1981.
36. COLIFORM SUBCOMMITTEE OF THE RESEARCH COMMITTEE OF THE
NATIONAL MASITIS COUNCIL
Coliform mastitis - A review
J. Dairy Sci. 62:1-22, 1979.
37. CONROD, J.D. and YONEDA K.
Complement and opsonins in alveolar secretions and serum
of rats with pneumonia due to Streptococcus pneumoniae
Rev. Infect. Dis. 3:310-322, 1981.
38. COOPER, N.R.
Laboratory evaluation of complement activation
In: Clinical Laboratory Techniques for the 1980s
A.R. Liss Inc., New York, 1980, 393-410.
39. CORBEIL, L.B.
Role of the complement system in immunity and immunopa-
thology
Veterinary Clinics of North America 8:585-611, 1978.
40. CULBERTSON, M.R.
Bovine hemostatic and complement systems
Ph.D. Thesis, University of California Davis, 1978.
41. DAMERAU, B., ZIMMERMANN, B., GRÜNEFELD, E., CZORNIK, K.
and VOGT, W.
Biological activities of C5a and C5a-desArg from hog
serum
Int. Arch. Allergy appl. Immunol. 63:408-414, 1980.
42. DAVID, J.R., GÖTZL, E.J. and AUSTEN, K.F.
Effector systems: The classic and alternative complement
sequences and their activators
In: Smith, L.M. and Thier, S.O., The biological princi-
ples of disease
W.B. Saunders, Philadelphia, 1981, 220-234.
43. DAVILS, S.F., CLIFFORD, D.P., HOIDAL, J.R. and REPINE, J.E.
Opsonic requirements for the uptake of Cryptococcus neo-
formans by human polymorphonuclear leukocytes and mono-
cytes
J. Infect. Dis. 145:870-874, 1982.

44. DAVIS, C.E., BROWN, K.R., DOUGLAS, H., TATE, W.J. and BRAUDE, A.I.
Prevention of death from endotoxin with antisera:
I. The risk of fatal anaphylaxis to endotoxin
J. Immunol. 102:563-572, 1969.
45. DE CUENINCK, B.J.
C142 complement activity and conglutinin in bovine milk
Int. Arch. Allergy appl. Immunol. 59:323-327, 1979.
46. DENSEN, P. and MANDELL, G.L.
Phagocyte strategy vs. microbial tactics
Rev. Infect. Diseases 2:817-838, 1980.
47. DIAS DA SILVA, W.
Complement
In: Fundamentals in immunology
Springer Verlag, Heidelberg, 1981, pp 111-130.
48. ECKBLAD, W.P., HENDRIX, K.M. and OLSON, D.P.
Total complement hemolytic activity of colostrum whey and sera from dairy cows
Cornell Vet. 71:54-58, 1981.
49. EDEBO, L., NORMANN, B., SKOGH, T. and STJERNSTRÖM, I.
Properties of antibodies of different immunoglobulin classes in relation to opsonisation
Monogr. Allergy 17:48-69, 1981.
50. EDELSON, P.J.
Intracellular parasites and phagocytic cells: Cell biology and pathophysiology
Rev. Infect. Dis. 4:124-135, 1982.
51. EDWARDS, K.M., GEWURZ, H., SOKALSKI, S.J., CHAN, L. and LINT, T.F.
Antibody and complement in the stimulation of neutrophil chemiluminescence by *Neisseria meningitidis*: Studies in a patient with complete deficiency of C7
J. Infect. Dis. 145:65-71, 1982.
52. EISENBERG, R.A., THEOFILOPOULOS, A.N. and DIXON, F.J.
Use of bovine conglutinin for the assay of immune complexes
J. Immunol. 119:1428-1434, 1977.
53. ELIN, R.J. and WOLFF, S.M.
Biology of endotoxin
Advances in Immunology 127-141, 1976.
54. ELSBACH, P.
Degradation of microorganisms by phagocytic cells
Rev. Infect. Dis. 2:106-128, 1980.

55. FERNANDEZ, H.N., HENSON, P.M., OTANI, A and HUGLI T.E.
Chemotactic response to human C3a and C5a anaphylatoxins
1. Evaluation of C3a and C5a leukotaxis in vitro and
under simulated in vivo conditions
J. Immunol. 120:109-115, 1978.
56. FINE, D.P., MARNEY, S.R., COLLEY, D.G., SERGENT, J.S. and
DES PREZ, R.M.
C3 shunt activation in human serum chelated with EGTA
J. Immunol. 109:807-809, 1972.
57. FINE, D.P.
Comparison of ethyleneglycoltetraacetic acid and its
magnesium salt as reagents for studying alternative com-
plement pathway function
Infect. Immun. 16:123-128, 1977.
58. FORSGREN, A. and QUIE, P.G.
Opsonic activity in human serum chelated with ethylene
glycoltetra-acetic acid
Immunology 26:1251-1256, 1974.
59. FOX, L.K., HEALD, C.W., GWAZDAUSKAS, F.C. and VINSON, W.E.
Concentrations of glucocorticoids, bovine serum albumin,
and somatic cells in mastitic milk
J. Dairy Sci. 64:2258-2261, 1981.
60. FRANK, M.M., SCHREIBER, A.D. and ATKINSON, J.P.
Studies of the interaction of antibody, complement, and
macrophages in the immune clearance of erythrocytes
In: Bellanti, J.A. and Dayton, D.H.: The Phagocytic Cell
in Host Resistance
Raven Press, New York, 1975, pp 101-116.
61. FRANK, M.M.
Complement
Current Concepts, The Upjohn Company, 1-48, 1975.
62. FRANK, M.M.
The complement system in host defense and inflammation
Rev. Infect. Diseases 1:483-501, 1979.
63. GEWURZ, H., PICKERING, R.J. and GOOD, R.A.
Complement and complement component activities in dis-
eases associated with repeated infections and malignancy
Int. Arch. Allergy 33:368-388, 1968.
64. GIGLI, I.
The complement system: Mechanisms of action, biology and
participation in dermatological diseases
In: Good, R.A. and Day, S.B., Comprehensive immunology,
Vol. 7: Immunodermatology
Plenum Medical Book, New York, 1981, pp 65-100.
65. GOETZL, E.J. and AUSTEN, K.F.
Active site chemotactic factors and the regulation of the
human neutrophil chemotactic response
Antibiotics and Chemotherapy 19:218-232, 1974.

66. GOLDSTEIN, I. M.
Polymorphonuclear leukocyte functions: Role of the plasma membrane
Current Topics in Hematology 2:145-202, 1979.
67. GOODMAN, M.L., WAY, B.A. and IRWIN, J.W.
The inflammatory response to endotoxin
J. Pathol. 128:7-13, 1979.
68. GORSKI, J.P., HUGLI, T.E., MÜLLER-EBERHARD, H.J.
Characterization of human C4a anaphylatoxin
J. Biol. Chem. 256:2707-2711, 1981.
69. GRANT, C.K.
Complement "specificity" and interchangeability:
Measurement of hemolytic complement levels and use of the complement-fixation test with sera from common domesticated animals
Am. J. Vet. Res. 38:1611-1617, 1977.
70. GRIFFIN, F.M.
Opsonization
In: R.A. Good and S.B. Day, Comprehensive immunology, Vol 2:
Biological amplification systems in immunology
Plenum Medical Book, New York, 1977, pp 85-113.
71. HADDING, U.
Possible contribution of the complement system to the inflammatory state
AAS 7:24-32, 1980.
72. HASTINGS, M.J.G. and EASMON, C.S.F.
Variations in the opsonic requirements of group B Streptococcus type III
Br. J. exp. Pathol. 62:519-525, 1981.
73. HED, J.
Response of polymorphonuclear leukocytes to particles opsonized with IgG or C3b
Monogr. Allergy 17:92-111, 1981.
74. HED, J. and STENDAHL, O.
Differences in the ingestion mechanisms of IgG and C3b particles in phagocytosis by neutrophils
Immunology 45:727-736, 1982.
75. HILL, A.W.
Factors influencing the outcome of Escherichia coli mastitis in the dairy cow
Res. Vet. Sci. 31:107-112, 1981.
76. HILL, H.R., HOGAN, N.A., BALE, J.F. and HEMMING, V.G.
Evaluation of nonspecific (alternative pathway) opsonic activity by neutrophil chemiluminescence
Int. Arch. Allergy appl. Immunol. 53:490-497, 1977.

77. HOIDAL, J.R., SCHMELING, D. and PETERSON, P.K.
Phagocytosis, bacterial killing, and metabolism by
purified human lung phagocytes
J. Infect. Dis. 144:61-71, 1981.
78. HOKAMA, Y. and NAKAMURA, R.M.
The complement system
In: Immunology and Immunopathology
Little, Brown and Company, Boston, 1982, pp 221-248.
79. HORWITZ, M.A.
Phagocytosis of microorganisms
Rev. Infect. Dis. 4:104-123, 1982.
80. HOSEA, S.W., BROWN, E.J. and FRANK M.M.
The critical role of complement in experimental pneumo-
coccal sepsis
J. Infect. Dis. 142:903-909, 1980.
81. HOWARD, C.J., TAYLOR, G. and BROWNLIE, J.
Surface receptors for immunoglobulin on bovine polymor-
phonuclear neutrophils and macrophages
Res. Vet. Sci. 29:128-130, 1980.
82. HUGLI, T.E. and CHENOWETH, D.E.
Biologically active peptides of complement: Techniques
and significance of C3a and C5a measurements
In: R.M. Nakamura, W.R. Dito, E.S. Tucker, Immunoassays:
Clinical laboratory techniques for the 1980s
A.R. Liss, Inc., New York, 1980, pp 443-460.
83. JAIN, N.C. and JASPER, D.E.
Viable cells in bovine milk
Br. Vet. J. 123:57-63, 1967.
84. JAIN, N.C., SCHALM, O.W., CARROLL, E.J. and LASMANIS, J.
Leukocytes and tissue factors in the pathogenesis of
bovine mastitis
Am. J. Vet. Res. 33:1137-1145, 1972.
85. JAIN, N.C.
Neutrophil leukocytes and inflammation of the bovine
mammary gland
Theriogenology 6:153-173, 1976.
86. JAIN, N.C., SCHALM, O.W. and LASMANIS, J.
Neutrophil kinetics in endotoxin-induced mastitis
Am. J. Vet. Res. 39:1662-1667, 1978.
87. JENSEN, D.L. and EBERHART, R.J.
Total and differential cell counts in secretions of the
nonlactating bovine mammary gland
Am. J. Vet. Res. 42:743-747, 1981.

88. JOHNSTON, R.B., LEHMEYER, J.E. and GUTHRIE L.A.
Generation of superoxide anion and chemiluminescence by human monocytes during phagocytosis and on contact with surface-bound immunoglobulin G
J. Exp. Med. 143:1551-1556, 1976.
89. KELLER, H.U., HESS, M.W. and COTTIER, H.
Reassessment of neutrophil locomotion and chemotaxis
Cutaneous Immunopathol. 80:411-418, 1978.
90. KILSHAW, P.J. and SLADE, H.
Milk protein immune complexes in the cow and calf
J. Reproductive Immunol. 3:227-236, 1981.
91. KUNKEL, S.L., FANTONE, J.C. and WARD, P.A.
Complement mediated inflammatory reactions
Pathobiology annual, Vol. 11,
Raven Press, New York, 1981, pp 127-154.
92. LACHMANN, P.J.
Conglutinin and immunoconglutinins
In: F.J. Dixon, J.H. Humphrey, *Advances in immunology*,
Vol.6, Academic Press, New York, 1967, pp 479-527.
93. LARSEN, G.L., MITCHELL, B.C. and HENSON, P.M.
The pulmonary response of C5 sufficient and deficient mice to immune complexes
Am. Rev. Respir. Dis. 123:434-439, 1981.
94. LAURELL, C.B.
Electroimmuno assay
Scand. J. clin. Lab. Invest. 29:21-38, 1972.
95. LAWRENCE, W.D., PACKMAN, C.H., ROWE, J.M. and LICHTMAN, M.A.
Attachment of particle-bound IgG and complement to human neutrophils
Blood 58:772-781, 1981.
96. LEIJH, P.C.J., VAN DEN BARSELAAR, M.T., DAHA, M.R. and VAN FURTH, R.
Participation of immunoglobulins and complement components in the intracellular killing of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by human granulocytes
Infect. Immun. 33:714-724, 1981.
97. LEIJH, P.C.J., VAN DEN BARSELAAR, M.T., DAHA, M.R. and VAN FURTH, R.
Stimulation of the intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by monocytes: Regulation by immunoglobulin G and complement components C3/C3b and B/Bb
J. Immunol. 129:332-337, 1982.
98. LINSOOTT, W.D. and TRIGLIA, R.P.
Methods for assaying nine bovine complement components and C3b-inactivator
Mol. Immunol. 17:729-740, 1980.

99. LINSCHOTT, W.D. and TRIGLIA, R.P.
The bovine complement system
In: J.E. Butler, The ruminant immune system
Plenum Press, New York, 1981, pp 413-430.
100. LISIEWICZ, T.
Phagocytic properties of neutrophils
In: Human neutrophils
The Charles Press Publishers, Inc., Bowie, MD, 1978,
pp 95-114.
101. MACKIE, D.P., POLLOCK, D.A. and LOGAN, E.F.
In vitro bactericidal assay of bovine polymorphonuclear
leucocytes against a group B streptococcus
Res. Vet. Sci. 33:240-242, 1982.
102. McCall, C.E.
Complement
South. Med. J. 72:47-52, 1979.
103. McDONALD, J.S. and ANDERSON, A.J.
Total and differential somatic cell counts in secretions
from noninfected bovine mammary glands: The early nonlac-
tating period
Am. J. Vet. Res. 42:1360-1365, 1981.
104. McGUIRE, T.C., MUSOKE, A.J. and KURTTI, T.
Functional properties of bovine IgG1 and IgG2: Interac-
tion with complement, macrophages, neutrophils and skin
Immunol. 38:249-256, 1979.
105. McLEAN, R.H. and NILSON, S.
Complement in human diseases
In: N.R. Rose, P.E. Bigazzi, Methods in immunodiagnosis
John Wiley & Sons, New York, 1980, pp 129-142.
106. MAYER, M.M.
Complement and lysis
In: N.R. Rose, F. Milgram, C.J. Van Oss, Principles of
immunology
McMillan Publishing Co., New York, 1979, pp 121-146.
107. MEUWISSEN, H.J., RHEE, M.S., RYNES, R.I. and
PICKERING, R.J.
Phagocytosis, chemoluminescence, and intracellular kil-
ling of fungi by phagocytes from subjects with deficiency
of the second component of complement
Int. Arch. Allergy appl. Immunol. 68:22-27, 1982.
108. MILLS, L.L. and QUIE, P.G.
Congenital disorders of the functions of polymorphonu-
clear neutrophils
Rev. Infect. Diseases 2:505-517, 1980.
109. MORRISON, D.C. and KLINE, L.F.
Activation of the classical and properdin pathways of
complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS)
J. Immunol. 118:362-368, 1977.

110. MORRISON, D.C. and RYAN, J.L.
Bacterial endotoxins and host immune responses
Adv. Immunol. 28:293-448, 1979.
111. MÜLLER-EBERHARD, H.J.
Complement and phagocytosis
In: J.A. Bellanti, D.H. Dayton, The phagocytic cell in host resistance
Raven Press, New York, 1975, pp 87-99.
112. MÜLLER-EBERHARD, H.J.
Chemistry and function of the complement-system
Hosp. Pract. 12:33-43, 1977.
113. MÜLLER-EBERHARD, H.J.
Complement abnormalities in human disease
Hosp. Pract. 13:65-76, 1978.
114. MÜLLER-EBERHARD, H.J.
Complement reaction pathways
In: M. Fougereau, J. Dausset, Progress in immunology, Vol.3
Academic Press, New York, 1980, pp 1001-1024.
115. MÜLLER-EBERHARD, H.J. and SCHREIBER, R.D.
Molecular biology and chemistry of the alternative pathway of complement
In: H.G. Kunkel, F.J. Dixon, Advances in immunology, Vol. 29
Academic Press, New York, 1980, pp 1-53.
116. MÜLLER, J., ALFÖLDY, P. and LEMMEL, E.M.
Nitroblue-tetrazolium test for the functional evaluation of phagocytic cells: A critical analysis of the methodology
Agents Actions 11:384-390, 1981.
117. MÜLLER, R. and CARROLL, E.J.
Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitation of immunoglobulin G bound to *Escherichia coli*
Am. J. Vet. Res. 42:1735-1737, 1981.
118. MÜLLER, R., MÜLLER, J., BERCHTOLD, M. and THALLER, M.
Agglutinine in Blut- und Milchserum von Kühen mit akuten Coli-Mastitiden
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 94:41-44, 1981.
119. MÜLLER, R., CARROLL, E.J. and PANICO, L.
Complement C3 levels and haemolytic activity in normal and mastitic whey
Zbl. Vet. Med. B 29:99-106, 1982.
120. MÜLLER, R., BOOTHBY, J.B., CARROLL, E.J. and PANICO, L.
Changes of complement levels in calves during the first month of life
Am. J. Vet. Res. 44:747-750, 1983.

121. MUSHI, E.Z. and RURANGIRWA, F.R.
Immunoglobulins, haemolytic complement and serum C3 in cattle infected with malignant catarrhal fever herpesvirus
Vet. Res. Comun. 5:57-62, 1981.
122. NEWBY, I.J., STOKES, C.R. and BOURNE, F.J.
Immunological activities of milk
Vet. Immunol. Immunopathol. 3:67-64, 1982.
123. NILSSON, U.R.
Complement activation in opsonization
Monogr. Allergy 17:70-91, 1981.
124. NUSSENZWEIG, V.
Interaction between complement and immune complexes:
Role of complement in containing immune complex damage
In: M. Fougereau, J. Dausset, Progress in Immunology, Vol. 3
Academic Press, New York, 1980, pp 1044-1056.
125. OLDSTONE, M.B.A., SISSONS, J.G.P. and FUJINAMI, R.S.
Action of antibody and complement in regulating virus infection
In: M. Fougereau, J. Dausset, Progress in Immunology, Vol. 2
Academic Press, New York, 1980, pp 599-621.
126. OLSSON, I., OLOFSSON, T., VENGE, P. and WINQUIST, I.
Release of biologically active compounds from neutrophil and eosinophil leukocyte granules
Monogr. Allergy 17:130-147, 1981.
127. OSLER, A.G., RANDALL, H.G. and HILL, B.M.
Studies on the mechanism of hypersensitivity phenomena
J. Exp. Med. 110:311-339, 1959.
128. PAAPE, M.J., SCHULTZE, W.D., GUIDRY, A.J., KORTUM, W.M. and WEINLAND, B.T.
Effect of an intramammary polyethylene device on the concentration of leukocytes and immunoglobulins in milk and on the leukocyte response to Escherichia coli endotoxin and challenge exposure with Staphylococcus aureus
Am. J. Vet. Res. 42:774-783, 1981.
129. PANG, A.S.D. and ASTON, W.P.
Alternative complement pathway in bovine serum: Lysis of human erythrocytes
Am. J. Vet. Res. 38:355-359, 1977.
130. PEREZ, H.D. and GOLDSTEIN, I.M.
Regulation of the biologic activity of C5-derived peptides
In: G. Weissmann, Advances in Inflammation Research
Raven Press, New York, 1981, pp 1-19.

131. PETERSON, P.K. and QUIE, P.G.
Bacterial surface components and the pathogenesis of infectious diseases
Annu. Rev. Med. 32:29-43, 1981.
132. PFAUNDLER, M. und MORO, E.
Über hämolytische Substanzen der Milch
Z. exp. Path. Ther. 4:451-455, 1907.
133. PILLEMER, L., BLUM, L. and LEPOW, I.H.
The properdin system and immunity. 1. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena
Science 120:279-280, 1954.
134. PONDMAN., K. W.
Role of complement in inflammation
Proc. Fourth Europ. Immunol. Meeting, Budapest, 331-334, 1978.
135. PORTER, R.R. and REID, K.B.M.
Activation of the complement system by antibody-antigen complexes: The classical pathway
In: C.B. Aufinsen, J.T. Edsall, F.M. Richards, Advances in protein chemistry, Vol.33
Academic Press, New York, 1979, pp 1-71.
136. PORTER, R.R.
The complex proteases of the complement system
Proc. R. Soc. Lond. B 210:477-498, 1980.
137. QUIE, P.G.
The phagocytic system in host defense
Scand. J. Infect. Dis., Suppl. 24:30-34, 1980.
138. QUIE, P.G.
Humoral factors in host defense against microbial invaders
Scand. J. Infect. Dis., Suppl. 31:34-40, 1982.
139. RAPP, H.J. and BORSOS, T.
Molecular basis of complement action
Appleton Century Crofts, New York, 1970.
140. RAUM, O., DONALDSON, V.H., ROSEN, F.S. and ALPER, C.A.
Genetics of complement
Curr. Top. Hematol. 3:111-174, 1980.
141. REID, K.B.M.
Mechanisms of the activation of the classical and alternative pathways of complement
In: M.P. Dierich, A. Fust, M.W. Turno, Triggering of phagocytic cells
Medicina Publishing House, Budapest, 1980, pp 15-38.
142. REITER, B. and ORAM, J.D.
Bacterial inhibitors in milk and other biological fluids
Nature 216:328-330, 1967.

143. REITER, B. and BROCK, J.H.
Inhibition of *Escherichia coli* by bovine colostrum and post-colostral milk: Complement-mediated bactericidal activity of antibodies to a serum susceptible strain of *E. coli* of the serotype O 111
Immunology 28:71-82, 1975.
144. RENSCHAW, H.W., ECKBLAD, W.P., TASSINARI, P.D. and EVERSON, D.O.
Levels of total haemolytic complement activity in paired dairy cow-newborn calf sera
Immunology 34:801-805, 1978.
145. RENSCHAW, H.W. and EVERSON, D.O.
Classical and alternate complement pathway activities in paired dairy cow-newborn calf sera
Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 1:259-267, 1979.
146. REYNARD, A.M.
The regulation of complement activity by pharmacologic agents
J. Immunopharmacol. 2:1-47, 1980.
147. RICE, C.E. and BOULANGER, P.O.
The interchangeability of the complement components of different animal species
J. Immunol. 68:197-205, 1952.
148. RICE, C.E. and DUHAMEL, L.
A comparison of the complement, conglutinin, and natural anti-sheep red cell antibody titres of the serum of new born and older calves
Can. J. Comp. Med. 21:109-116, 1957.
149. ROBINSON, J.E., HARVEY, B.A.M., and SOOTHILL, J.F.
Phagocytosis and killing of bacteria and yeast by human milk cells after opsonisation in aqueous phase of milk
Br. Med. J. 1:1443-1445, 1978.
150. ROOT, R.K. and COHEN, M.S.
The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils
Rev. Infect. Dis. 3:565-598, 1981.
151. ROSE, J.E., AMERAULT, T.E. and ROBY, T.O.
Complement activity and conglutinin activity in stored bovine sera
Am. J. Vet. Res. 40:421-422, 1979.
152. ROTH, J.A. and KAEBERLE, M.L.
Evaluation of bovine polymorphonuclear leukocyte function
Vet. Immunol. Immunopathol. 2:157-174, 1981.
153. ROWLEY, D.
Endotoxins and bacterial virulence
J. Infect. Dis. 123:317-327, 1971.

154. RURANGIRWA, F.R., TABEL, H., LOSOS, G. and TIZARD, I.R.
Hemolytic complement and serum C3 levels in Zebu cattle infected with *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* and the effect of trypanocidal treatment
Infect. Immun. 27:832-836, 1980.
155. SCHADELIN, J., SCHADELIN, R. and MANDELL, G.L.
Chemiluminescence of phagocytic cells
CRC-Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 13:1-19, 1980.
156. SCHREIBER, R.D., PANGBURN, M.K. LESAVRE, P.H. and MÜLLER-EBERHARD, H.J.
Initiation of the alternative pathway of complement: Recognition of activators by bound C3b and assembly of the entire pathway from six isolated proteins
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3984-3952, 1978.
157. SCHREIBER, R.D. and MÜLLER-EBERHARD, H.J.
New developments in the activation of the alternative pathway of complement
In: Immunoassays: Clinical Laboratory Techniques for the 1980s
A.R. Liss, New York, 1980, pp 411-431.
158. SCHULTZ, D.R.
Complement in host defense
Scand. J. Infect. Dis., Suppl. 24:22-29, 1980.
159. SCRIBNER, D.J. and FAHRNEY, D.
Neutrophil receptors for IgG and complement: Their roles in the attachment and ingestion phases of phagocytosis
J. Immunol. 116:892-897, 1976.
160. SETO, A., OKABE, T., SASAKI, N. and ITO, Y.
Opsonic activity of O-agglutinins against *Escherichia coli* in bovine colostrum
Am. J. Vet. Res. 37:635-638, 1976.
161. SHEPPARD, N.J., HOLMES, W. and TIZARD, I.
Experimental bovine trypanosomiasis: Changes in serum immunoglobulins, complement and complement components in infected animals
Immunology 35:817-826, 1978.
162. SILVERBLATT, F.J., DREYER, J.S. and SCHAUER, S.
Effect of pili on susceptibility of *Escherichia coli* to phagocytosis
Infect. Immun. 24:218-223, 1979.
163. SNYDERMAN, R. and PHILLIPS, J.K. and MERGENHAGEN, S.E.
Biological activity of complement in vivo: Role of C5 in the accumulation of polymorphonuclear leukocytes in inflammatory exudates
J. Exp. Med. 134:1131-1143, 1971.

164. SNYDERMAN, R. and PIKE, M.C.
Biological aspects of leukocyte chemotaxis
In: R.A. Good, S.B. Day, Comprehensive immunology, Vol.2
Plenum Publishing Corp., New York, 1977, pp 162-181.
165. SNYDERMAN, R. and PIKE, M.C.
Mechanisms of nonspecific host resistance
In: R.A. Good, S.B. Day, Comprehensive immunology, Vol.7
Plenum Medical Book, New York, 1981, pp 101-114.
166. SOLBERG, C.O., KALAGER, T., HILL, H.R. and GLETTE, J.
Polymorphonuclear leukocyte function in bacterial and
viral infections
Scand. J. Infect. Dis. 14:11-18, 1982.
167. STANSFIELD, W.D.
Complement and cytotoxicity
In: Serology and immunology
Macmillan Publishing, New York, 1981, pp 200-238.
168. STENDAHL O., DAHLGREN, C., EDEBO, M. and ÖHMAN, L.
Recognition mechanisms in mammalian phagocytosis
Monogr. Allergy 17:12-27, 1981.
169. TABEL, H.
Alternative pathway of bovine complement. Immunochemical
studies on factor B-like serum protein
Can. J. Comp. Med. 45:291-298, 1981.
170. TACHIBANA, D.K.
Characterization of the bactericidal action of precolo-
stral piglet and calf sera against gram negative enteric
bacteria in rough phase
Folia Microbiol. 10:145-155, 1965.
171. TAKAHASHI, M., TAKAHASHI, S. and HIROSE, S.
Solubilization of antigen-antibody complexes: A new func-
tion of complement as a regulator of immune reactions
Prog. Allergy 27:134-166, 1980.
172. TOLLE, A.
Die subklinische Kokkenmastitis des Rindes. Eine Übersicht
Zbl. Vet. Med. B 29:329-358, 1982.
173. TRAUTWEIN, G.
Immunkomplex-Krankheiten bei Mensch und Tieren
Zbl. Vet. Med. B 29:165-185, 1982.
174. IRIKURA, R.P. and LINSFOTT, W.D.
Titers of nine complement components, conglutinin and
C3b-inactivator in adult and fetal bovine sera
Mol. Immunol. 17:741-748, 1980.
175. VAN DIJK, W.C., VERBRUGH, H.A., VAN ERNE-VAN DER TOL,
M.E., PETERS, R. and VERHOEF, J.
Escherichia coli antibodies in opsonisation and protec-
tion against infection
J. Med. Microbiol. 14:381-389, 1981.

176. VERBRUGH, H.A., VAN DIJK, W.C., VAN ERNE, M.E.,
PETERS, R., PETERSON, P.K. and VERHOEF, J.
Quantitation of the third component of human complement
attached to the surface of opsonized bacteria: Opsonin-
deficient sera and phagocytosis-resistant strains
Infect. Immun. 26:808-814, 1979.
177. VERBRUGH, H.A.
Phagocytosis and destruction of *Staphylococcus aureus*
Vet. Quart. 3:91-97, 1981.
178. VERHOEF, J., PETERSON, P.K. and QUIE, P.G.
Human polymorphonuclear leukocyte receptor for *Staphylo-*
coccal opsonins
Immunology 33:231-239, 1977.
179. WALDVOGEL, F.A.
Pathophysiological mechanisms in pyogenic infections: Two
examples - pleural empyema and acute bacterial meningitis
In: G.Majno, R.S. Cotran, N. Kaufmann, Current topics in
inflammation and infection
Williams & Wilkins, Baltimore, 1982, pp 115-122.
180. WALKER, R.I. and WILLEMZE, R.
Neutrophil kinetics and the regulation of granulopoiesis
Rev. Infect. Dis. 2:282-292, 1980.
181. WANNAMAKER, L.W.
Virulence factors in *Streptococci*
Scand. J. Infect. Dis., Suppl. 31:22-27, 1982.
182. WARD, G.E. and SEBUNYA, T.K.
In vitro phagocytosis and killing of coliforms by bovine
mammary leukocytes
Am. J. Vet. Res. 42:1941-1943, 1981.
183. WARD, G.E. and SEBUNYA, T.K.
Somatic and capsular factors of coliforms which affect
resistance to bovine serum bactericidal activity
Am. J. Vet. Res. 42:1937-1940, 1981.
184. WARD, P.A.
Inflammatory proteins: Chemical and biological aspects
Clin. biochem. 13:187-190, 1980.
185. WEATHERALL, D.J., BUNCH, D. and SHARP, A.A.
The pathophysiology of the leukocytes
In: Smith, L.H., Thier, S.O., Pathophysiology: The biolo-
gical principles of disease
W.B. Saunders, Philadelphia, 1981, pp 419-438.
186. WEISDORF, D.J., HAMMERSCHMIDT, D.E., JACOBS, H.S. and
CRADDOCK, P.R.
Rapid in vivo clearance of C5a des arg: A possible pro-
tective mechanism against complement-mediated tissue
injury
J. Lab. Clin. Med. 98:823-830, 1981.

187. WHITED, S.C. and GALLIN, J.I.
Neutrophil chemotaxis
Int. J. Dermatol. 19:130-138, 1980.
188. WILKINSON, P.C.
Aspects of neutrophil locomotion and chemotaxis
Cutaneous Immunopathol. 80:419-430, 1978.
189. WILKINSON, P.C.
Leukocyte locomotion and chemotaxis: Effects of bacteria and viruses
Rev. Infect. Dis. 2:293-318, 1980.
190. WILLIAMS, M.R. and BUNCH, K.J.
Variation among cows in the ability of their blood polymorphonuclear leucocytes to kill *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*
Res. Vet. Sci. 30:298-302, 1981.
191. WINKELSTEIN, J.A.
The role of complement in the host's defense against *Streptococcus pneumoniae*
Rev. Infect. Dis. 3:289-298, 1981.
192. WINTER, A.J.
Mechanisms of immunity in bacterial infections
Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 23:53-69, 1979.
193. WINTROUB, B.U.
Inflammation and mediators
Int. J. Dermatol. 19:436-442, 1980.
194. WOODARD, L.F., ECKBLAD, W.P., OLSON, D.P., BULL, R.C. and EVERSON, D.O.
Hemolytic complement levels of neonatal calves delivered from protein-energy malnourished dams and subjected to cold stress
Cornell Vet. 70:266-271, 1980.
195. WOODARD, L.F., ECKBLAD, W.P., OLSON, D.P., BULL, R.C. and EVERSON, D.O.
Serum complement activity of protein-energy malnourished beef cows
Am. J. Vet. Res. 41: 1546-1548, 1980.
196. YONEMASU, K., SASAKI, T. and SHINKAI, H.
Purification and characterization of subcomponent C1q of the first component of bovine complement
J. Biochem. 88:1545-1554, 1980.
197. ZIV, G., HARTMAN, I., BOGIN, E., ABIDAR, J. and SARAN, A.
Endotoxin in blood and milk and enzymes in the milk of cows during experimental *Escherichia coli* endotoxin mastitis
Theriogenol. 6:343-352, 1976.

198. ZWAHLEN, A., NYDEGGER, U.E., VAUDAUX, P., LAMBERT P. and WALDVOGEL, F.A.
Complement-mediated opsonic activity in normal and infected human cerebrospinal fluid: Early response during bacterial meningitis
J. Infect. Dis. 145:635-646, 1982.

Die vorliegende Arbeit wurde zur Hauptsache während eines zweijährigen Studienaufenthaltes an der University of California, Davis, USA durchgeführt. Dieser Aufenthalt wurde durch ein Stipendium des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der Wissenschaften ermöglicht. Es ist mir deshalb ein Anliegen, allen herzlich zu danken, die dazu beigetragen haben, dass ich in den Genuss dieses Stipendiums kommen konnte.

Ein spezieller Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Carroll und Herrn Prof. Dr. Jasper vom Department of Clinical Pathology, University of California, Davis für die mir gewährte Gastfreundschaft und ihre vorbehaltlose Unterstützung, die sie mir während dieser Zeit zukommen liessen.

Ganz besonders danken möchte ich meinem verehrten Lehrer und Förderer Herrn Prof. Dr. M. Berchtold für alle die grossen und kleinen Hilfen, die er mir in seiner uneigenützigen Art gewährt hat.

